

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
der Justus Liebig-Universität zu Gießen
Direktor: Professor Dr. Th. Schliesser

Serologische Typendifferenzierungen
aviärer Mykobakterienstämme
isoliert von Tieren

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von
Ute Neumeier
Tierärztin aus Ensheim

Gießen 1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546402_0010

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
der Justus Liebig-Universität zu Gießen
Direktor: Professor Dr. Th. Schliesser

Serologische Typendifferenzierungen
aviärer Mykobakterienstämme
isoliert von Tieren

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von
Ute Neumeier
Tierärztin aus Ensheim

Gießen 1974

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin in Gießen

Dekan: Professor Dr. H. Goller

Berichterstatter: Professor Dr. Th. Schliesser

Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.1974



Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Einleitung	1
B. Schrifttum	2
I. Allgemeines	2
II. Mykobakterien der Gruppe III nach RUNYON	4
1. Kulturelles Verhalten	4
2. Biochemisches Verhalten	5
3. Tierexperimentelles Verhalten	8
III. Serotypen der aviären Mykobakterien	10
1. Nomenklatur	10
2. Typisierung mittels Agglutinationsverfahren	12
3. Typisierung mittels Immunfluoreszenz	14
IV. Herstellung von Antisera gegen Mykobakterien	17
V. Serotypen aviärer Mykobakterien isoliert von Mensch, Tier und deren Umgebung	20
1. Vorkommen beim Menschen	20
2. Vorkommen beim Tier	24
a) Schwein	24
b) Rind	27
c) Geflügel	28
d) Andere Tiere	29
3. Vorkommen in der Umgebung von Mensch und Tier	31
C. Eigene Untersuchungen	33
I. Material und Methodik	33
1. Herstellung typenspezifischer Antisera	33
a) Versuchstiere	33
b) Bakterienstämme	33
c) Pufferlösung	34
d) Antigenherstellung	35

	Seite
e) Immunisierungsverfahren	36
f) Blutentnahme und Serumgewinnung	40
g) Antikörperbestimmung in der Langsam- agglutination	40
h) Immunfluoreszenz	41
i) Hühnerversuche	43
2. Serotypisierung von aviären Mykobakterien- stämmen	44
a) Bakterienstämmen	44
b) Herstellung der Bakteriensuspension	45
c) Agglutinationsverfahren	45
II. Ergebnisse	46
1. Herstellung typenspezifischer Antiseren	46
2. Serotypisierung von aviären Mykobakterien- stämmen	50
D. Diskussion	52
I. Herstellung von Immunseren	52
II. Die Brauchbarkeit der Immunfluoreszenz	56
III. Serotypisierung aviärer Mykobakterienstämmen	58
E. Zusammenfassung	61
F. Literaturverzeichnis	63

A. Einleitung

Erkrankungen bei Tieren, die auf eine Infektion mit *M. bovis*, dem Erreger der Rindertuberkulose zurückzuführen sind, stellen heute im Seuchengeschehen nur noch seltene, sporadische Einzelfälle dar. Daher finden seit der Sanierung der tuberkulösen Rinderbestände Infektionen mit *M. avium* oder auch anderen "atypischen" Mykobakterien vermehrt Beachtung und man muß in solchen Fällen die Tuberkulose heute eher im Sinne einer "Mykobakteriose" verstehen (SCHLIESSER, 63).

"Atypische" Mykobakterien der Gruppe III nach RUNYON haben ihre Bedeutung vor allem darin, daß sie einmal für das Auftreten paraspezifischer Tuberkulinreaktionen bei Rindern und zum anderen in hohem Maße für die tuberkulösen Veränderungen in den Lymphknoten des Verdauungstraktes bei Schwein und Rind verantwortlich sind. In diesem Zusammenhang kommt vor allem epidemiologischen Untersuchungen große Bedeutung zu. Die von SCHAEFER (54, 55) entwickelte Methode der Serotypisierung ist eine wertvolle Hilfe zur weiteren Differenzierung des *M. avium*-*M. intracellulare*-Komplexes.

In Deutschland liegen bisher relativ wenige Arbeiten über Serotypisierungen von Mykobakterien vor. Mir wurde deshalb die Aufgabe gestellt, typenspezifische Antisera gegen aviäre Mykobakterien herzustellen und mit diesen in der Mykobakteriendiagnostik angefallene Stämme serologisch zu typisieren.

B. Schrifttum

I. Allgemeines

Unter dem Begriff "atypische Mykobakterien" werden diejenigen Mykobakterien zusammengefaßt, die nicht als Mykobakterien atypisch sind, sondern die als atypische Erreger von Erkrankungen angesehen werden, für deren Entstehung man seit Robert KOCH praktisch allein die klassischen Erreger der Säugertuberkulose, nämlich *M. tuberculosis* und *M. bovis* verantwortlich gemacht hat (SCHLIESER, 65).

Die sogenannten "atypischen" Mykobakterien werden auf Grund der von RUNYON (52) aufgestellten Kriterien der Farbstoffbildung und Wachstumsgeschwindigkeit in 4 Gruppen eingeteilt:

- Gruppe I: Photochromogene Mykobakterien mit durch kurze Lichteinwirkung induzierbarer Bildung eines gelben Pigments, langsam wachsend.
- Gruppe II: Scotochromogene Mykobakterien mit Bildung eines gelben bzw. gelb-orangen Pigments sowohl in Dunkelheit als auch unter Lichteinwirkung, langsam wachsend.
- Gruppe III: Nicht photochromogene Mykobakterien mit fehlender Pigmentbildung, langsam wachsend.
- Gruppe IV: Schnellwachsende Mykobakterien mit oder ohne Pigmentbildung.

Die RUNYON'sche Einteilung ist unter rein humanmedizinischen Gesichtspunkten vorgenommen worden und ist deshalb für den veterinärmedizinischen Bereich sehr problematisch. Unbefriedigend ist vor allem der Umstand, daß der Gruppe III u. a. auch *M. avium* zugeordnet wird, das in der

Veterinärmedizin als klassischer Tuberkuloseerreger (für das Geflügel) gilt. Das Schema nach RUNYON ist aber international bewährt und bildet eine gemeinsame Basis für die vergleichende Betrachtung der Rolle dieser Mykobakterien bei Mensch und Tier. Obwohl man den "atypischen" Mykobakterien eine gewisse Pathogenität im allgemeinen Sinne für Haussäugetiere nicht absprechen kann, fehlt ihnen doch die eigentliche Bedeutung als Infektionserreger. Sie besitzen keine Virulenz und keine Infektiosität und die in Frage kommenden Wirte sind mit Ausnahme des Huhnes nur in geringem Maße empfänglich (SCHLIESSER, 66).

Für die Veterinärmedizin besonders wichtig ist die Gruppe III nach RUNYON (Tabelle 1). In diese Gruppe werden heute die fakultativ pathogenen Species *M. avium*, *M. intracellulare* (früher auch als "Battey-Stämme" bezeichnet) und *M. xenopi* eingeordnet; außerdem die für Mensch und Tier so gut wie immer apathogenen Species der sogenannten Radish-complex-Gruppe mit *M. terrae*, *M. nonchromogenicum*, *M. novum* und *M. triviale* (MEISSNER, 39). Über die Klassifizierung der letzten 4 Species ist man sich aber bis heute noch nicht einig.

Tabelle 1: Atypische Mykobakterien

Gruppe (nach RUNYON)	Charakteristisches Merkmal	Species bzw. Varianten
I	photochromogen	M. kansasii M. marinum M. ulcerans M. gastri
II	scotochromogen	M. aquae M. aquae var. ureolyticum M. scrofulaceum M. flavescens
III	nicht photochromogen	M. avium M. intracellulare M. xenopi M. terrae M. novum M. triviale
IV	schnell wachsend	M. aurum M. borstelense M. brunense M. diernhoferi M. fortuitum M. marinum M. parafortuitum M. phlei M. smegmatis M. thamnophaeos M. vaccae

II. Mykobakterien der Gruppe III nach RUNYON

1. Kulturelles Verhalten

Das Wachstum bei verschiedenen Temperaturen hat in der Gruppe III nach RUNYON mehr einen statistischen Aussagewert (MEISSNER, 39). Die apathogenen Species wachsen alle bei 22°C und nicht bei 45°C. Die pathogenen Species

dagegen wachsen nur zum Teil sowohl bei 22°C als auch bei 45°C. Nach MEISSNER (39) deutet Wachstum bei 45°C auf die Zugehörigkeit zur fakultativ pathogenen Gruppe hin.

NASSAL (41) fand, daß eine Unterscheidung zwischen echten aviären und aviumähnlichen Mykobakterien durch Bebrütung bei 45°C nicht immer gelingt, weil es auch aviäre Stämme gibt, die in diesem Temperaturbereich nicht wachsen.

Bis auf *M. xenopi* sind alle Stämme der Gruppe III in der Primärkultur farblos. *M. xenopi* wächst mit einem zart-gelben Pigment. Bei längerem Stehen am Licht können die pathogenen Species strohgelb bis lederfarben werden, während die apathogenen Stämme weißlich bis ährenfarben bleiben (MEISSNER, 39).

M. avium und *M. intracellulare* wachsen auf Löwenstein-Jensen-Eiernährboden glatt und dysgon mit Pleomorphismus. Bei frisch isolierten Stämmen von *M. avium* sind häufig transparente, zarte Formen, auf denen dann opake, kuppelförmige sog. "domed" Kolonien auswachsen und langsam die transparenten überwuchern, zu beobachten. Auf dem Middlebrook 7 H 10-Agar können die verschiedenen Kolonieförmungen oft deutlich ausgeprägt sein. *M. xenopi* dagegen wächst ebenfalls dysgon, aber in rauhen Kolonien, die vogel-nest- oder seeigelähnliche Formen aufweisen können. Die Stämme der sog. Radish-complex-Gruppe wachsen eugon. *M. terrae* und *M. nonchromogenicum* zeigen glattes, *M. tri-viale* und *M. novum* rauhes Wachstum (MEISSNER, 39).

2. Biochemisches Verhalten

Mit Hilfe von biochemischen Tests können in der Gruppe III die fakultativ pathogenen Species sicher von den apathogenen getrennt werden. Insbesondere das Verhalten

in der Amid-Reihe nach BÖNICKE (9) und im β -Galaktosidase-Test (KUBALA, 31) erlauben eine Differenzierung der beiden Gruppen. Diese Unterteilung kann durch die Tween-Hydrolyse (WAYNE et al., 77) und den Phosphatase-Test (KAPPLER, 22) ergänzt werden. Außerdem können zur weiteren Unterscheidung die Nitratreduktase-Reaktion (VIRTANEN, 76) sowie die Arylsulfatase-Aktivität (BLÜMEL, 8) mitverwendet werden. Die beiden letztgenannten Möglichkeiten sind für eine exakte Differenzierung der Species der Gruppe III allerdings nur bedingt brauchbar. Eine Übersicht bringt Tabelle 2.

Eine sichere Differenzierung zwischen *M. avium* und *M. intracellulare* mittels biochemischer Verfahren ist bis heute noch umstritten. Nach Untersuchungen von SWEENEY und JANN (73) soll sich *M. avium* von sog. Battey-Stämmen dadurch unterscheiden, daß nur *M. avium* Xylose unter Säurebildung vergärt. Das umgekehrte Verhältnis besteht wiederum für Trehalose, die von den Battey-Stämmen vergoren wird, aber nicht von *M. avium*.

STENBERG und TURUNEN (71) unterscheiden *M. avium* und die Battey-Stämme ebenfalls auf Grund ihres Verhaltens gegenüber den beiden Kohlenhydraten Xylose und Trehalose.

Auch der Mandelamin-Test ist für die Differenzierung von echten aviären und aviumähnlichen Mykobakterienstämmen nur bedingt tauglich (NASSAL und FRITSCH, 42).

Tabelle 2: Biochemisches Verhalten der Mykobakterien der Gruppe III nach RUNYON (WEISSNER, 39)

Mycob. species	Ami- de Ga- lak- to- sid.	Kol. Morph.	Präp. Z.N.	Tween- Hydrol.	Phos- phat.	Ni- trat- red.	Aryl- sulf. 3 Tg.	EMB sen- sib.	Wachstum 22° 42° 45°	patho- gen Huhn i.v.	Immuno- log. Teste
M. avium	5,6 o	glatt tr.-do.	o.B.	o	o	o	o	res. o/(+)	+	+/(o)	spezif.
M. intra-cellulare	5,6 o	glatt tr.-do.	o.B.	o	o	o	o	res. +/(o)	+	o/+	spezif.
M. xenopi	5,6 o	rauh Vogel- nest gelb	fä- dig. Gewe- be	o	o	o	+	res. o	+	++	+/(o) spezif.
M. terrae	5,6 +	glatt	o.B.	+	+	+/(o)	+/(o)	s. +	+/(o)	o	?
M. nonchromog.		grau- nul. eugon									
M. novum	o	rauh eugon	o.B.	+	+	+/(o)	o/+	s. +	o/(+)	o	?
M. tri-viale	o	rauh eugon	o.B.	+	+	o/+	+/(o)	s. +	+/(o)	o	?

+/(o) = pos. neg. o/+ = neg. pos. () = einzelne Stämme

3. Tierexperimentelles Verhalten

Als einzig anerkanntes Kriterium der Zugehörigkeit zu *M. avium* wurde bis vor kurzem die Pathogenität für Hühner angesehen. Die Virulenz der Stämme ist aber von der verwendeten Infektionsdosis und der Art der Applikation abhängig. Der für *M. avium* spezifische Sektionsbefund zeigt in der Regel eine septikämisch verlaufende Erkrankung. Besonders betroffen sind Leber und Milz.

NASSAL (40) empfiehlt die intravenöse Verabreichung von 0,1 mg Bakterienmasse bei 6 - 8 Wochen alten Hühnern, während er die intramuskuläre Infektion als ungeeignet ansieht.

MEISSNER (38) verwendet zur Infektion der Hühner 2 Dosierungen und zwar 0,1 und 1,0 mg i.v.

SCHAEFER (58) empfiehlt die Verabreichung von 0,5 ml Kultur mit einem Gehalt von 10^7 bis 10^8 lebenden Mykobakterien in die Jugularvene von zehn Tage alten Hühnern.

KAZDA und DORNETZHUBER (26) befürworten dagegen die i.m. Inokulation von 1,0 mg Bakterienmasse. Aufgrund ihrer Untersuchungsergebnisse bezeichnen sie einen Stamm nur dann als *M. avium*, wenn dieser nach experimenteller Infektion tuberkulöse Veränderungen bei Hühnern hervorruft. Das Sterben nach septischer Krankheitsform erachten sie als nicht spezifisch für *M. avium*.

Virulenzunterschiede bei *M. avium*-Stämmen hängen teilweise mit der Kolonieform zusammen.

KRAUSE (30) berichtet über das Verhalten der glatten und rauhen Varianten von *M. avium* im Tierversuch. Sie fand bei ihren Untersuchungen, daß die glatte Form viel geringer pathogen ist als die Rauhform. Dementsprechend gelingt

bei infizierten Hühnern der Nachweis von glatten *M. avium*-Formen viel seltener als der von rauen Varianten.

Untersuchungen von SCHAEFER et al. (59) ergaben, daß transparente Formen von *M. avium* sowohl für Hühner (i.v. Infektion) als auch für Mäuse (aerogene Infektion) pathogen waren. Von opak wachsenden Stämmen erwiesen sich für das Huhn 2 von 5 untersuchten Stämmen und für Mäuse 2 von 7 Stämmen als virulent. Die höchste Pathogenität, sowohl für Hühner als auch für Mäuse, besaßen die rauen Formen, die in ihrer Wirkung die transparenten, d. h. glatten, Varianten übertrafen.

Nach Einführung der Serotypisierung von *M. avium* und aviumähnlichen Mykobakterien stellte sich heraus, daß sich Hühnerversuche für die Differenzierung nicht mehr als zuverlässig erweisen. Hinzu kommt die Tatsache, daß aus der Gruppe III nicht nur Stämme von *M. intracellulare*, sondern auch *M. xenopi* für Hühner virulent sein können (MEISSNER, 38, 39; ANZ, LAUTERBACH, MEISSNER und WILLERS, 3). Auch konnte nachgewiesen werden, daß gelegentlich Stämme von *M. avium* Serotyp II, der im allgemeinen als hühnervirulent gilt, für Hühner avirulent sein können (ANZ und MEISSNER, 1). ANZ und MEISSNER (4) führten beim Huhn vergleichende Virulenzprüfungen zwischen transparenten und opaken Kolonien verschiedener Serotypen der *M. avium*/*M. intracellulare*-Gruppe durch. Sie fanden, daß transparente Koloniekulturen sowohl von *M. avium* Serotyp II als auch von *M. intracellulare* Serotyp Davis für Hühner virulent sind; opake Kolonien dagegen waren avirulent oder kaum virulent. Dagegen erwiesen sich transparente sowie opake "domed" Formen der Serotypen Boone, Howell und VII/Howell (ein Doppelsertyp) für Hühner als avirulent.

III. Serotypen der aviären Mykobakterien

1. Nomenklatur

Im Jahre 1965 berichtete SCHAEFER (55) über die Möglichkeit, bei Mykobakterien durch Agglutination mit spezifischen Immunseren Untersuchungen zur Speciesbestimmung durchzuführen. SCHAEFER (55, 56, 57, 58) berichtete in mehreren Arbeiten über die Ergebnisse der serologischen Untersuchungen und konnte in der *M. avium*/*M. intracellulare*-Gruppe 20 verschiedene Serotypen nachweisen. Die einzelnen Serotypen wurden von SCHAEFER mit römischen Ziffern und Eigennamen bezeichnet. In neuerer Zeit wurde diese Nomenklatur ersetzt durch fortlaufende Numerierung (THOEN et al., 74; WOLINSKY et al., 78). Die gegenwärtige Einteilung zeigt Tabelle 3.

Tabelle 3: Einteilung und Nomenklatur der Serotypen der *M. avium*/*M. intracellulare*-Gruppe

SCHAEFER-System		USDA -System *
<i>M. avium</i> Serotyp	I	1
	II ₂	2
	II ₃	3
<i>M. intracellulare</i> Serotyp	IV	4
	V	5
	VI	6
	VII	7
	Davis	8
	Watson	9
	III a	10
	III b	11
	Howell	12
	Chance	13
	Boone	14
	Dent	15
	Yandle	16
	Wilson	17
	Altmann	18
	Darden	19
	Arnold	20

* = USDA: United States Department of Agriculture
(THOEN et al., 74)

Auf Grund eines Vergleiches von Serotyp und Hühnervirulenz teilt MEISSNER (39) Stämme des *M. avium*/*M. intracellulare*-Komplexes in 3 verschiedene Gruppen ein:

Gruppe 1: *M. avium*, Serotyp I und II, die sog. "echten" *M. avium*-Stämme. Als Isolate von Vögeln oder Tieren sind sie bis auf wenige Ausnahmen hühnervirulent und geben in simultanen Sensitin-Tests eine *M. avium*-Reaktion.

Gruppe 2: *M. intracellulare*-Stämme mit den Serotypen VII, Boone, Darden, Arnold, Yandle und Altmann, welche für Hühner stets avirulent sind und in Hauttests eine positive Reaktion mit *M. intracellulare*-Sensitin geben.

Gruppe 3: Die sog. "intermediäre Gruppe" mit den Serotypen III, IV, V, VI, Davis und Watson. Sie geben in simultanen Sensitin-Tests stets eine *M. avium*-Reaktion, gleich ob es sich um hühnervirulente Stämme handelt oder nicht.

YODER und SCHAEFER (79) verglichen ebenfalls die Ergebnisse ihrer serologischen Differenzierungen mit Pathogenitätstests bei Hühnern und unterteilen auf Grund des Virulenzverhaltens die in der Gruppe III nach RUNYON gefundenen Serotypen nur in 2 Gruppen: *M. avium*-Serotypen (pathogen) und *M. intracellulare*-Serotypen (apathogen). Von 159 als "*M. avium*" serotypisierten Stämmen (isoliert von Hühnern und anderen Tierarten) besaßen 155 Hühnerpathogenität; allerdings auch 10 von 30 als "*M. intracellulare*" angesprochenen Serotypen.

2. Typisierung mittels Agglutinationsverfahren

Serologische Methoden, die zur Differenzierung von Mykobakterien angewandt worden sind, reichen von der Objekt-trägerschnellagglutination über die Agar-Gel-Diffusion, die Präzipitinreaktion, Meinicke-Flockungsreaktion und Betonite-Flockungstest bis hin zur Komplementbindungsreaktion.

Bei den atypischen Mykobakterien der Gruppe III jedoch wird seit den grundlegenden Untersuchungen von SCHAEFER (54) fast ausnahmslos von allen Autoren die Agglutinationsmethode angewandt. Da die Ablesbarkeit von Agglutinationsreaktionen an die Verwendung homogener und stabiler Bakterienaufschwemmungen gebunden ist, kommen für diese Art der Untersuchung nur glatt ("smooth") wachsende Stämme in Frage. Bei den aviären Mykobakterien bestehen diese Schwierigkeiten selten. Sie stellen daher ein geeignetes Material für Agglutinationsuntersuchungen dar (ANZ, MEISSNER und RÖDER, 2).

SCHAEFER selbst hat seine Methode immer weiter verbessert und in zahlreichen Arbeiten (54, 55, 56, 57, 58) seine Untersuchungsmethodik ausführlich beschrieben und mit ihrer Hilfe epidemiologische Untersuchungen durchgeführt.

SAITO et al. (53) führten 1968 mit der SCHAEFER'schen Methode Typendifferenzierungen an ihrem Untersuchungsmaterial durch. Die Autoren beurteilten das Verfahren als sehr brauchbar, besonders auch im Hinblick auf die Einrichtung zentraler Mykobakterien-Referenzlabors.

Auch von dem Belgier PATTYN (44) wurde die Agglutinationsmethode angewandt und als eine bedeutsame Ergänzung für die Typendifferenzierung der aviären Mykobakterien angesehen.

KUBIN et al. (33) konnten mit Hilfe der Seroagglutination den Beweis erbringen, daß *M. brunense* mit *M. intracellulare*, Serotyp Davis identisch ist. Auch sie stellen die Bedeutung der Seroagglutination für epidemiologische Untersuchungen heraus.

RÖDER (51) konnte bei der serologischen Untersuchung von 102 atypischen Mykobakterienstämmen der Gruppe III 15 Serotypen ermitteln. 1/3 der ihm zur Verfügung stehenden, in Deutschland isolierten nicht hühnervirulenten Stämme ließ sich jedoch mit den von SCHAEFER hergestellten Antisera gegen 15 verschiedene Serotypen nicht erfassen.

ANZ et al. (2) verwendeten ebenfalls die Agglutination zur Serotypisierung von atypischen Mykobakterienstämmen. Sie wiesen außerdem auf Schwierigkeiten bei der Herstellung hochtitriger, spezifisch agglutinierender Seren hin. Mit Absättigungsversuchen konnten sie diese Schwierigkeiten ausschalten.

ENGEL und BEERWALD (13) modifizierten die sog. SCHAEFER'sche Agglutinationsmethode (Röhrchenagglutination), indem sie die weniger arbeitsaufwendige und vereinfachte Objektträgeragglutination heranzogen. Beim Vergleich der Ergebnisse beider Methoden zeigten 800 untersuchte Stämme eine maximale Übereinstimmung.

REZNIKOV und LEGGO (50) empfanden ebenso wie ENGEL und BEERWALD (13) die Arbeitsaufwendigkeit, die relativ komplizierte Methodik und die Kostspieligkeit der SCHAEFER'schen Agglutinationsmethode als großen Nachteil. Ihre Verbesserungsvorschläge beruhen darauf, daß die zur Herstellung der Antigensuspension benötigten Bakterien nur auf 7 H10-Agarplatten vorgezchtet werden und bei der Agglutination statt der vorgeschriebenen 0,5 ml-Dosen

für Serum und Antigen nur 0,1 ml-Dosen verwendet werden. Außerdem vereinfachten sie den Beurteilungsschlüssel für das Ablesen der Agglutinationsreaktion. Nach Mitteilung der Autoren wurden mit dieser modifizierten Technik die gleichen Ergebnisse wie mit der Standardmethode erhalten. Ferner schlugen REZNIKOV et al. (50) auf Grund ihrer Untersuchungsergebnisse vor, die Zahl der Standardseren auf die Hälfte einzuschränken.

Eine weitere Modifizierung der SCHAEFER'schen Methode wird von JUHLIN und WINBLAD (21) beschrieben. In ihren Untersuchungen absorbierten sie die typenspezifischen Mykobakterien-Antiseren bzw. deren Globulinfraktion an Staphylokokken-Protein A. Ferner führten sie die Agglutination auf Mikrotiterplatten durch, indem sie je 3 Tropfen Mykobakteriensuspension und absorbiertes Mykobakterienglobulin verwendeten. Die Autoren betonen die Übereinstimmung ihrer auf diese Weise ermittelten Ergebnisse mit denen von SCHAEFER.

MATSUI und KAWANISHI (37) berichteten über ihre Schwierigkeiten bei der Herstellung stabiler Antigensuspensionen für die Agglutinationsreaktion. Durch Zusatz von Tween-80 zu der bei der Antigenherstellung verwendeten physiologischen Kochsalzlösung in einer Konzentration von 0,5 - 1 % konnten sie bei 22 von 34 Stämmen eine Spontanagglutination verhindern.

3. Typisierung mittels Immunfluoreszenz

Ein nicht zu unterschätzender Nachteil der Agglutinationsmethode ist die Tatsache, daß rauh wachsende Stämme infolge ihrer Neigung zur Spontanagglutination oft nicht typisiert werden können. Deshalb haben verschiedene Arbeitsgruppen versucht, bei der Differenzierung von Mykobakterien die Technik der Immunfluoreszenz anzuwenden.

SHEPARD und KIRSH berichteten (69, 70), daß ihre Versuche mit der Immunfluoreszenz bei Mykobakterien, die sie über einen längeren Zeitraum durchgeführt haben, wenig erfolgreich verlaufen sind. Die Autoren glauben auf Grund der fehlenden Publikationen auf diesem Gebiet, daß auch andere Untersucher auf die gleichen Schwierigkeiten gestoßen seien. Sie stellten bei Mykobakterien u.a. auch beim "Battey-Typ" fest, daß die am besten antigen wirksame Fraktion im Protoplasma der Zelle vorliegt. Als störend erwies sich auch die lipidhaltige Hülle bei serologischen Techniken, die in wässrigen Medien durchgeführt werden. Auf Grund dieser Befunde arbeiteten SHEPARD und KIRSH (69, 70) mit Protoplasmafraktionen, die sie nach Aufschluß der Mykobakterien durch Zerstören der Zellwand erhielten. Die Autoren wiesen aber darauf hin, daß sie trotzdem mit dieser Methode die bei Mykobakterien auftretenden und störenden Kreuzreaktionen nicht ausschalten konnten.

Auch JONES, SAITO und KUBICA (18) führten immunfluoreszenzserologische Untersuchungen mit verschiedenen Mykobakterienarten durch. Ebenso wie schon GILLISEN (15) konnten sie mit *M. tuberculosis*, *M. kansasii* und *M. phlei* gute Resultate erzielen. Kreuzreaktionen zwischen den Antiseren von *M. avium* und anderen Stämmen der Gruppe III nach RUNYON stellten auch für sie ein nicht zu lösendes Problem dar. Nach weiterer zweijähriger Forschung auf diesem Gebiet veröffentlichte die gleiche Arbeitsgruppe (JONES und KUBICA, 19) eine Arbeit, in der sie mitteilen, daß es ihnen gelungen sei, Kreuzreaktionen weitgehend auszuschalten. Nach ihren Untersuchungen ist der positive Ausfall der Agglutinationsreaktion unmittelbar vom Vorhandensein eines spezifischen, hochtitrigen Immunserums abhängig. Nach der Konjugation sinkt z. B. in der

Langsamagglutination der Titer eines Serums von 1:2560 auf 1:32 ab. Die Verfasser betrachten einen Titer des Konjugats von mindestens 1:8 für unerlässlich, um in der Immunfluoreszenz spezifische Ergebnisse zu erhalten.

BENNEDSEN (6) verfolgte beim Kaninchen mit Hilfe der Immunfluoreszenz den Verlauf der Antikörperbildung während der Infektionsperiode. Methodische Schwierigkeiten ergaben sich zum einen wegen der starken Autofluoreszenz der Mykobakterien und zum anderen dadurch, daß durch die notwendige Fixierung der Ausstriche die Fluoreszenzintensität bei diesen Keimen stark herabgesetzt wird.

In einer weiteren Arbeit befaßte sich BENNEDSEN (7) speziell mit der Immunfluoreszenz bei *M. avium*-Stämmen. Nach Anwendung sowohl der direkten als auch der indirekten FA-Technik kam er zu dem Ergebnis, daß bei Kaninchen durch Infizierung mit *M. avium* typenspezifische Antikörper erhalten werden können. Auf diese Weise konnten mit 9 spezifischen Konjugaten 56 von 62 Stämmen der Gruppe III nach RUNYON typisiert werden. BENNEDSEN (7) konnte mit Hilfe der indirekten Technik bei allen untersuchten Seren eindeutige Reaktionen nachweisen. Mit der direkten FA-Technik war dagegen der Ausfall der Reaktionen nicht immer einwandfrei abzulesen; so war es mit ihrer Hilfe z. B. nicht möglich, zwischen den beiden Serotypen Davis und IV zu unterscheiden.

Die Australier CHOI, ROYAL und FRANCIS (11) entwickelten eine Antikomplement-FA-Technik mit der sie sogar zwischen den Serotypen I und II von *M. avium* unterscheiden konnten. Auch die Serotypen Altmann, Boone, Darden, Davis, Howell, Wilson, Yandle und VII gaben mit dieser komplizierten Technik spezifische Reaktionen, allerdings erst bei Verwendung des Konjugats in einer Verdünnung von mindestens 1:64.

GILMOUR (16) schreibt, daß er im direkten FA-Test M. avium, M. johnei und BCG-Stämme unterscheiden konnte, wenn er den jeweils höchsten Titer als typen- bzw. art-spezifisch ansah.

Erst vor kurzem berichteten auch MARTINS, WALKER, BATAYIAS und GALES (36) über gute Ergebnisse im direkten FA-Test. So konnten sie mit Hilfe dieser Technik unter anderem die Serotypen Boone und Howell unterscheiden. Wie viele andere Autoren vor ihnen betonen sie aber die Unerläßlichkeit des Vorhandenseins spezifischer hochtitriger Immunseren für die Herstellung von Konjugaten.

IV. Herstellung von Antiseren gegen Mykobakterien

Von den meisten Autoren wird zur Gewinnung von Mykobakterien-Antiseren die von SCHAEFER (55) beschriebene Methodik angewandt. Für die Immunisierung von Kaninchen schwemmte SCHAEFER glatt gewachsene Kulturen von Ölsäure-Albumin-Agarplatten mit PBS-Puffer mit 0,5 % Phenol, pH 7,0, ab. Diese Suspensionen wurden dann in einem Coleman junior Spectrophotometer bei einer Wellenlänge von 525 m μ auf eine optische Dichte von 0,3 eingestellt. Zur Abtötung wurden die Antigene anschließend für 30 Minuten im Wasserbad bei 80°C erhitzt.

Die Immunisierung der Kaninchen erfolgte 8 mal innerhalb eines Zeitraumes von 4 Wochen mit Dosen von 1-2 ml i.v. in die Ohrvene. 6 Tage nach der letzten Injektion wurden die Tiere entblutet.

An diese Empfehlung hielten sich auch SAITO und KUBICA (53), KUBIN et al. (32), PATTYN (44), ANZ et al. (1, 2),

MARKS et al. (35), RÖDER (51), ENGEL und BERWALD (13), KARLSON et al. (23), ONET (43), PIENING et al. (45), THOEN et al. (74), TSUKAMURA und NEMOTO (75) sowie YUGI et al. (81).

Die Arbeitsgruppen von JONES (18, 19) sowie von CHOI (11) modifizierten das SCHAEFER'sche Verfahren. Sie immunisierten in wöchentlichen Intervallen Kaninchen i.v. mit lebenden Mykobakteriensuspensionen in steigenden Dosen (0,1; 0,3; 0,6 und 1,0 ml). Die Suspensionen waren im Coleman junior Spectrophotometer auf eine optische Dichte von 0,1 eingestellt worden. Betrag der Titer einer entnommenen Serumprobe in der Agglutination mindestens 1:1280, so wurden die Kaninchen 5 Tage nach der 4. Injektion entblutet.

LIND (34) verwendete als Antigen zur Herstellung von präzipitierenden Antiseren für die Agar-Gel-Diffusion nicht erhitzte, konzentrierte Kulturfiltrate von SAUTON-Medium, die er zusammen mit einem Adjuvans Kaninchen oder Schafen wiederholt injizierte.

BENNEDSEN (7) fand in seinen Untersuchungen, daß Antikörper, die zu Beginn einer Infektionsperiode gebildet werden, gegen homologe Antigene sehr spezifisch reagieren. Aus diesem Grunde infizierte er die Kaninchen nur einmal i.v. mit 10^7 lebenden Mykobakterieneinheiten. 14 bis 21 Tage nach der Infektion wurden die Tiere entblutet. Führte diese Art der Infizierung nicht zu der gewünschten Titerhöhe von mindestens 1:316, so wurde die Infektion mit einer Dosis von 10^8 Keimen wiederholt. Der Verfasser wies in seiner Arbeit ausdrücklich darauf hin, daß die Tiere spätestens am 21. Tag nach der Immunisierung getötet wurden.

GILMOUR (16) verwendete ebenfalls Kaninchen für die Herstellung von Immunseren gegen *M. avium*. Als Ausgangsantigen diente eine Bakteriensuspension mit der Dichte 2 nach BROWN. Tiere einer Versuchsgruppe erhielten dann je 1,0 ml der 1:100 verdünnten Ausgangssuspension, Tiere einer anderen Gruppe bekamen je 1,0 ml der 1:1000 verdünnten Ausgangssuspension i.v.. Die Kaninchen der erstgenannten Versuchsgruppe starben i. a. 13 - 16 Tage nach der Infektion, während die Tiere der anderen Gruppe am Leben blieben. Auf diese Weise erhielt GILMOUR (16) spezifische, wenn auch nicht sehr hochtitrige Immunseren.

YUGI und NOZAKI (81) gewannen Immunseren gegen *M. bovis* und *M. paratuberculosis* von Kaninchen, die sie in wöchentlichen Intervallen 5 mal mit einer hitzeabgetöteten Suspension von je 10 mg Bakterienmasse pro ml Paraffinum liquidum intramuskulär immunisiert hatten. Immunseren gegen *M. intracellulare* stellten sie von Ziegen her, die sie mit 5 mal 10^9 Einheiten lebender Keime i.m. infizierten.

MARTINS et al. (36) verabreichten Kaninchen i.v. in wöchentlichen Abständen und steigenden Dosen (0,1 bis 1,0 ml) ein durch UV-Behandlung abgetötetes Antigen. Auf diese Weise erhielten sie hochspezifische Immunseren, mit denen sie in der Immunfluoreszenz die beiden untersuchten Serotypen Boone und Howell unterscheiden konnten.

V. Serotypen aviärer Mykobakterien, isoliert von Mensch,
Tier und deren Umgebung

1. Vorkommen beim Menschen

SCHAEFER, der die grundlegenden Untersuchungen zur Serotypisierung der aviären Mykobakterien durchgeführt hat, berichtete in mehreren Arbeiten (55, 56, 57, 58) über die Ergebnisse der serologischen Typenbestimmungen (Tabelle 4). Er bezeichnete zahlreiche beim Menschen gefundene Typen mit dem jeweiligen Namen des betreffenden Patienten, wie z. B. Davis, Altmann, Boone etc.

KUBIN und MATUSKOVA (32) berichteten, daß sie in der Tschechoslowakei während eines Zeitraumes von 10 Jahren 44 durch aviäre Mykobakterien bedingte Krankheitsfälle, mit und ohne Beteiligung der Lunge, beobachten konnten. Mit Hilfe der SCHAEFER'schen Agglutinationsmethode wurde versucht, diese Stämme zu typisieren; in 21 Fällen konnte *M. avium* Serotyp 2 nachgewiesen werden.

In Deutschland hat die Arbeitsgruppe MEISSNER (ANZ und MEISSNER, 1; PIENING, ANZ und MEISSNER, 45; RÖDER, 51) versucht, die ihnen zur Verfügung stehenden, vom Menschen isolierten, aviären Mykobakterienstämme mittels Agglutination zu typisieren. Der Hauptanteil der typisierten Stämme entfiel auf *M. avium* Serotyp 2 und *M. intracellulare* Serotyp Davis.

BRAUN et al. (10) beschrieben 4 Halslymphknotenmykobakteriosen bei Kindern. 2 Stämme unterzogen sie einer Serotypisierung und konnten Serotyp IV bzw. Yandle nachweisen. In den beiden anderen Fällen konnten sie je einmal *M. avium* und *M. intracellulare* isolieren, die aber nicht weiter typisiert wurden.

THOEN (74) veröffentlichte Untersuchungsergebnisse von 469 aus Menschen isolierten Stämmen. 40 mal konnte er *M. avium* Serotyp I und 57 mal *M. avium* Serotyp II nachweisen. Die restlichen 372 Stämme faßte er unter dem Begriff "andere Serotypen" zusammen, ohne hierzu nähere Angaben zu machen.

REZNIKOV et al. (47) berichteten über die Isolierung von *M. intracellulare* Serotyp VI aus Sputum von gesunden Arbeitern eines Schweinezuchtbetriebes. In diesem Betrieb wurden bei Schlachtschweinen häufig tuberkulöse Veränderungen nachgewiesen, die durch Mykobakterien des gleichen Serotyps verursacht worden waren.

Verschiedene Autoren erweitern in ihren zahlreichen Mitteilungen vielfach die Angaben vorhergehender Publikationen durch neue Zahlenangaben. Es ist deshalb sehr schwer festzustellen, wieviel Stämme von der betreffenden Arbeitsgruppe wirklich untersucht worden sind. Aus diesem Grunde habe ich die Publikationen verschiedener Autoren, die Aufschluß über die Serotypisierung aviärer, vom Menschen isolierter Stämme geben, tabellarisch zusammengefaßt (Tabelle 4).

Tabelle 4: Veröffentlichungen über Serotypbestimmungen aviärer Mykobakterien isoliert von Menschen

Autor	Land	Zahl der untersuchten Stämme	Speciesverteilung	
			Zahl	Serotyp
SCHAEFER (55)	USA *	41	6	Av I
			7	Av II
			9	Davis
			9	Watson
			5	Boone
			5	Yandle

Fortsetzung Tabelle 4:

Autor	Land	Zahl der untersuchten Stämme	Speciesverteilung Zahl	Serotyp
SCHAEFER (57)	USA*	295	28	Av I
			47	Av II
			6	Av III
			17	Av IV
			2	Av V
			18	Av VI
			47	Av VII
			29	Davis
			24	Watson
			33	Boone
			19	Darden
			29	Yandle
			10	Altmann
			6	Arnold
SCHAEFER (58)	USA*	347	37	Av I
			54	Av II
			6	Av III
			22	Av IV
			2	Av V
			22	Av VI
			16	Av VII
			15	Howell
			11	Chance
			11	Altmann
			25	Yandle
			7	Wilson
			23	Watson
			29	Davis
KUBIN et al. (32)	CSSR	44	38	Boone
			21	Darden
			8	Arnold
			10	Av I
			21	Av II
			1	Av III
			2	Av IV
			1	Av VII
			4	Davis
			5	nicht typi- sierbar

* = und Stämme aus verschiedenen anderen Ländern wie
Holland, Wales, Australien, Nordamerika, Dänemark,
Tschechoslowakei

Fortsetzung Tabelle 4:

Autor	Land	Zahl der untersuchten Stämme	Speciesverteilung	
			Zahl	Serotyp
ANZ et al. (1)	BRD	106	10	Av I
			32	Av II
			6	Av IV
			4	Av VI
			6	Av VII
			18	Davis
			10	Watson
			2	Altmann
			4	Boone
			2	Yandle
			6	Darden
			6	Arnold
THOEN et al. (74)	USA	469	40	Av I
			57	Av II
			372	andere Sero- typen, nicht typisierbar
BRAUN et al. (10)	BRD	2	1	Av IV
			1	Yandle
MEISSNER (39)	BRD	62	7	Av I
			22	Av II
			4	Av IV
			2	Av VI
			11	Davis
			4	Watson
			3	Av VII
			2	Boone
			1	Yandle
			3	Darden
			2	Arnold
			1	Altmann
REZNIKOV et al. (47)	Austra- lien	17	17	Av VI
PIENING et al. (45)	BRD	70	8	Av I
			25	Av II
			4	Av IV
			2	Av VI
			11	Davis
			7	Watson
			3	Av VII
			2	Boone
			1	Yandle
			2	Arnold
			1	Altmann
			4	Darden

2. Vorkommen beim Tier

a) Schwein

Nach dem derzeitigen Stand werden *M. avium* und *aviumähnliche* Mykobakterien zu 90 bis 96 % als Erreger tuberkulöser Veränderungen in Mesenteriallymphknoten von Schlachtschweinen gefunden (SCHLISSER, 61; SEEGER et al., 68; SCHLISSER, 64). Die Einführung der Serotypisierung von Stämmen aus dem *M. avium*- *M. intracellulare*-Komplex ergab die Möglichkeit weiterer epidemiologischer Untersuchungen zum Auftreten der Schweinetuberkulose. Die zahlreichen Veröffentlichungen über Serotypbestimmungen von aus Schweinen isolierten Stämmen sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

Tabelle 5: Veröffentlichungen über Serotypbestimmungen aviärer Mykobakterien isoliert beim Schwein

Autor	Land	Zahl der untersuchten Stämme	Speciesverteilung Zahl	Serotyp
SCHAEFER (55)	USA *	15	10 5	Av I Av II
SCHAEFER (57)	USA *	68	16 18 5 4 3 3 10 5 1 2 1	Av I Av II Av III Av IV Av V Av VII Davis Watson Boone Altmann Arnold
SCHAEFER (58)	USA *	76	15 24 5 4 3 3 2 6 12 1 1	Av I Av II Av III Av IV Av V Howell Altmann Watson Davis Boone Arnold

* = und Stämme aus verschiedenen anderen Ländern wie Holland, Wales, Australien, Nordamerika, Dänemark, Tschechoslowakei

Fortsetzung Tabelle 5:

Autor	Land	Zahl der untersuchten Stämme	Speciesverteilung Zahl	Serotyp
KUBIN et al. (32)	CSSR	17	9 8	Av II Davis
ANZ et al. (1)	BRD	46	1 39 1 3 2	Av I Av II Av IV Davis Watson
KARLSON (23)	USA	25	6 18 1	Av I Av II Watson
PIENING et al. (45)	BRD Schleswig- Holstein	134	95 2 2 25 4 6	Av II Av III Av IV Davis Watson Av II/Watson
PIENING et al. (45)	BRD	479	8 378 1 8 75 8 1	Av I Av II Av III Av IV Davis Watson Av IV/Davis
ONET (43)	Rumänien	69	5 61 3	Av I Av II Davis
PATTYN (44)	Belgien	7	2 4 1	Av I Av II nicht typi- siert
JØRGENSEN (20)	Dänemark	20	20	Av II
THOEN et al. (74)	USA	189	43 86 60	Av I Av II nicht typi- siert

Fortsetzung Tabelle 5:

Autor	Land	Zahl der untersuchten Stämme	Speciesverteilung Zahl	Serotyp
YUGI et al. (80)	Japan	25	2	Av II
			1	Av III
			5	Av IV
			12	Davis
			2	Watson
			2	"neuer Typ"
			1	nicht typi- siert
STOLL (72)	BRD Hessen	32	1	Av I
			22	Av II
			7	Davis
			2	nicht typi- siert
SCHLIESSER et al. (67)	BRD Hessen	11	2	Av I
			5	Av II
			1	Davis
			3	nicht typi- sierbar
TSUKAMURA et al. (75)	Japan	11	3	Av IV
			3	Davis
			1	Watson
			1	Av III b
			3	"neue Typen"
KLEEGERG et al. (29)	Südafrika	114	18	Av I
			4	Av II
			11	Av III a
			18	Av IV
			17	Av IV/Davis
			2	Av I/Davis
			1	Av III a/ Davis
			1	Howell
			1	Altmann
			23	nicht typi- sierbar
MEISSNER (39)	BRD	158	5	Av I
			122	Av II
			2	Av IV
			26	Davis
			3	Watson
REZNIKOV (46)	Australien	39	39	Av VI

b) Rind

Beim Rind wurde in den letzten Jahren ein Absinken der Tuberkuloseinfektion durch *Mycobacterium bovis* beobachtet, wodurch Ansteckungen mit anderen Mykobakterien, vornehmlich mit *M. avium*, relativ zunehmen (SCHLIESSER und KATIKARIDIS, 62; SCHLIESSER, 64; DEDIE und SCHÖNE, 12).

Eine Übersicht über Serotypisierungen aviärer Mykobakterien beim Rind vermittelt Tabelle 6.

Tabelle 6: Veröffentlichungen über Serotypbestimmungen der aviären Mykobakterien isoliert beim Rind

Autor	Land	Zahl der untersuchten Stämme	Speciesverteilung Zahl	Serotyp
SCHAEFER (55)	USA *	2	2	Av I
SCHAEFER (57)	USA *	72	5 39 9 2 3 2 5 4 1 1 1	Av I Av II Av III Av IV Av V Av VII Davis Watson Boone Yandle nicht typi- sierbar
SCHAEFER (58)	USA *	98	6 42 10 8 3 1 8 3 2 5 9 1	Av I Av II Av III Av IV Av V Av VI Av VII Howell Yandle Watson Davis Boone

* = und Stämme aus verschiedenen anderen Ländern wie Holland, Wales, Australien, Nordamerika, Dänemark, Tschechoslowakei

Fortsetzung Tabelle 6:

Autor	Land	Zahl der untersuchten Stämme	Speciesverteilung	
			Zahl	Serotyp
KUBIN et al. (32)	CSSR	8	8	Av II
ANZ et al. (1)	BRD	29	2	Av I
			27	Av II
MEISSNER (39)	BRD	70	4	Av I
			64	Av II
			2	Davis
PIENING et al. (45)	BRD Schleswig- Holstein	1	1	Av II
PIENING et al. (45)	BRD	103	5	Av I
			95	Av II
			3	Davis
THOEN et al.	USA	323	32	Av I
			227	Av II
			64	nicht typi- siert
KLEEBERG et al. (29)	Südafrika	11	4	Av I
			1	Av II
			2	Av III
			1	Av IV
			1	Davis
			1	Watson
			1	Dent

c) Geflügel

Tabelle 7 gibt Aufschluß über die Veröffentlichungen von Serotypbestimmungen aviärer Mykobakterien isoliert aus Hühnern und anderen Vögeln.

Tabelle 7: Veröffentlichungen über Serotypbestimmungen aviärer Mykobakterien isoliert beim Huhn und anderen Vögeln

Autor	Land	Zahl der untersuchten Stämme	Speciesverteilung		Tierart
			Zahl	Serotyp	
SCHAEFER (55)	USA *	10	2	Av I	Huhn
			8	Av II	
		2	2	Av I	andere Vögel
SCHAEFER (57)	USA *	37	8	Av I	Huhn
			28	Av II	
			1	nicht typi- sierbar	
		17	7	Av I	andere Vögel
			8	Av II	
			2	nicht typi- sierbar	
SCHAEFER (58)	USA *	46	14	Av I	Huhn
			31	Av II	
			1	nicht typi- sierbar	
		21	8	Av I	andere Vögel
			10	Av II	
			3	nicht typi- sierbar	
KUBIN et al. (32)	CSSR	4	4	Av II	Geflügel
ANZ et al. (1)	BRD	27	3	Av I	Huhn und andere Vögel
			23	Av II	
			1	Davis	
PIENING et al. (45)	Schleswig- Holstein	23	23	Av II	Huhn
	BRD	112	5	Av I	Huhn
			96	Av II	
			10	Davis	
			1	Av IV/Davis	
	BRD	17	1	Av I	Zoovögel
			15	Av II	
			1	Davis	

* = und Stämme aus verschiedenen anderen Ländern wie Holland, Wales, Australien, Nordamerika, Dänemark, Tschechoslowakei

Fortsetzung Tabelle 7:

Autor	Land	Zahl der untersuchten Stämme	Speciesverteilung		Tierart
			Zahl	Serotyp	
THOEN et al. (74)	USA	115	24	Av I	Huhn
			90	Av II	
			1	nicht typi- sierbar	
MEISSNER (39)	BRD	79	5	Av I	Huhn und andere Vögel
			72	Av II	
			2	Davis	
SCHAEFER (60)	USA	12	1	Av I	Huhn
			8	Av II	
			3	Av III	
		74	63	Av I	Gänsevö- gel
			10	Av II	
			1	nicht typi- sierbar	
PATTYN (44)	Belgien	2	2	Av II	Huhn
		30	12	Av I	Zoovögel
			9	Av II	
			2	Av V	
			7	nicht typi- sierbar	
ANZ et al. (2)	BRD	50	5	Av I	Huhn und andere Vögel
			44	Av II	
			1	Davis	

d) Andere Tiere

Auch bei anderen Tieren liegen vereinzelt Mitteilungen über Serotypbestimmungen vor. So berichten KAZDA und HOYTE (27), daß der Grasfrosch als Reservoir von M. intracellulare Serotyp Davis eine Rolle spielen kann.

3. Vorkommen in der Umgebung von Mensch und Tier

Über das Vorkommen atypischer Mykobakterien der Gruppe III in der Umgebung von Mensch und Tier wurden in den letzten Jahren zahlreiche Untersuchungen durchgeführt. Vor allem wird kontaminiertem Sägemehl eine gewisse Bedeutung für das manchmal enzootisch gehäufte Auftreten von Schweinetuberkulose beigemessen (Angaben von KAUKER und ZETTL, 24; BEERWERTH und POPP, 5; KLEEGERG und NEL, 29; KAUKER und RHEINWALD, 25; PIENING, ANZ und MEISSNER, 45).

Auch über Serotypbestimmungen von aviären Mykobakterien, die aus der Umgebung von Mensch und Tier isoliert worden sind, liegen in der Literatur Angaben vor (Tabelle 8).

Tabelle 8: Veröffentlichungen über Serotypbestimmungen aviärer Mykobakterien, isoliert aus der Umgebung von Mensch und Tier

Autor	Land	isoliert aus	Zahl der untersuchten Stämme	Speciesverteilung	
				Zahl	Serotyp
KUBIN et al. (32)	CSSR	Trinkwasser	5	2	Av II
				3	Davis
PIENING et al. (45)	BRD	Sägemehl	67	1	Av I
				3	Av II
				2	Av IV
				6	Av VI
				28	Davis
				10	Watson
				17	Doppelsero- typen
		Brunnenwasser	3	3	Davis
		Eiweißkonzentrat als Futtermittel	3	3	Av II
		Schweinekotproben	17	15	Av II
				2	Davis
		Hühnerkotproben	8	8	Av II

Fortsetzung Tabelle 8:

Autor	Land	isoliert aus	Zahl der untersuchten Stämme	Speciesverteilung	
				Zahl	Serotyp
KAUKER et al. (25)	BRD Hessen	Sägemehl, Tierkörpermehl, Fischmehl, Eiweißkonzentrat, Mastelweiß	9	9	Av II
KLEEBERG et al. (29)	Süd- afrika	Luzerne, Fischmehl, "teff" (engl.)	35	1	Av I
				2	Av II
				10	Av IV
				1	Av VII
				10	Davis
				3	Wilson
				1	Yandle
				7	nicht typi- siert
BEERWERTH et al. (5)	BRD	Sägemehl	10	1	Av IV
				1	Av VI
				4	Davis
		Schweinekotpr.	4	1	Watson
				3	Av IV/Davis
				3	Davis
SAITO et al. (53)	USA	Erdboden	7	5	Boone
				2	Yandle
REZNIKOV et al. (48)	Austra- lien	Hausmüll	22	2	Av VI
				3	Av VII
				3	Arnold
				4	Boone
				1	Darden
				2	Davis
				1	Howell
				2	Watson
				2	Wilson
				2	Yandle
KAZDA (28)	BRD Hamburg	Übergangsmoor	4	4	Davis
REZNIKOV et al. (49)	Austra- lien	Einstreu	6	4	Av, VI
				1	Boone
		Trinkwasser	4	1	nicht typi- siert
				3	Av VI
				1	nicht typi- siert

C. Eigene Untersuchungen

I. Material und Methodik

1. Herstellung typenspezifischer Antiseren

a) Versuchstiere

Für die Immunisierungsversuche wurden insgesamt 68 Kaninchen verwendet. Bei Versuchsbeginn betrug das Gewicht der ca. 4 - 5 Monate alten Tiere durchschnittlich 2 - 2,5 kg. Die Tiere wurden nach Geschlechtern getrennt in Bodenhaltung gehalten. Das Futter bestand aus Pellets (Altromin^R) sowie Trinkwasser ad libitum. Die Kennzeichnung der Tiere wurde mit der Tätowierzange vorgenommen. Außerdem standen für die Infizierung mit Mykobakterien acht 5 Wochen alte Junghühner einer Mastrasse zur Verfügung, die einzeln in Käfigen gehalten wurden.

b) Bakterienstämme

Für die Herstellung der typenspezifischen Antiseren standen 20 Mykobakterien-Referenzstämme zur Verfügung¹⁾. Es handelte sich um M. avium Serotyp I, II₂ und II₃ sowie M. intracellulare Serotyp III a, III b, IV, V, VI, Davis und Watson. Von jedem Serotyp lagen jeweils 2 verschiedene Referenzstämme vor (Tabelle 9). Die Stämme wurden auf Middlebrook 7 H 10 Schrägagar (Difco Nr. 0627-01) mit OADC enrichment (Difco Nr. 0722-64) gehalten.

Zur Gewinnung glatter Einzelkolonien wurden die Stämme auf Middlebrook 7 H 10 Agarplatten mit OADC enrichment überimpft und ca. 3 Wochen in feuchter Kammer bei 37°C bebrütet. Glatte, opak gewachsene Einzelkolonien wurden anschließend auf Schrägagar gleicher Zusammensetzung überimpft.

1) = Für die Überlassung der Stämme bin ich Herrn W. B. SCHAEFER, M.D., Chief of Experimental Microbiology am National Jewish Hospital and Research Center Denver, Colorado, zu Dank verpflichtet.

Tabelle 9: Bezeichnung und Serotyp der zur Herstellung der Immunsereen verwendeten Stämme von SCHAEFER

Bezeichnung der SCHAEFER'schen Referenzstämme	Bezeichnung in meinen Unter- suchungen	Serotyp	
ATCC 15769	I 15769	M. avium	I
16909-2380	I 16909	"	I
14141-1395	II ₂ 14141	"	II ₂
6194	II ₂ 6194	"	II ₂
Cardiff	II ₃ Cardiff	"	II ₃
577	II ₃ 577	"	II ₃
Iowa	IIIa Iowa	M. intracellulare	III a
1602-1965	IIIa 16020	"	III a
Vitoch	IIIb Vitoch	"	III b
14604	IIIb 14604	"	III b
P 55	IV P 55	"	IV
13528-1079	IV 13528	"	IV
4443-1237	V 4443	"	V
25546-759	V 25546	"	V
34540	VI 34540	"	VI
12315/67	VI 12315	"	VI
SG.B 12	Davis SgB	"	Davis
14658-1686	Davis 14658	"	Davis
17584-286	Watson 17584	"	Watson
6450-204	Watson 6450	"	Watson

c) Pufferlösung

Zur Abschwemmung der Mykobakterienkulturen wurde eine Pufferlösung verwendet. Zu diesem Zweck wurde eine Stammlösung (konzentrierte Phosphatpufferlösung) wie folgt angefertigt:

Na_2HPO_4	10,0 g
KH_2PO_4	4,0 g
NaCl	80,0 g

in 1000 ml Aqua dest. gelöst und 20 Min. bei 121°C autoklaviert.

Für jeden Versuchsansatz wurde eine Gebrauchslösung in folgender Zusammensetzung frisch hergestellt:

konzentrierte Phosphatpufferlösung	19,0 ml
5 %ige wässrige Phenollösung	19,0 ml
Aqua dest.	ad 200,0 ml

Der pH-Wert der Gebrauchslösung betrug 7,0.

d) Antigenherstellung

Pro Antigen wurde die gut bewachsene Schrägagarkultur (Alter ca. 15 - 20 Tage) eines Röhrchens in einem Zentrifugenröhrchen mit einem sterilen Glasstab unter Zugabe von einigen Tropfen Puffer-Gebrauchslösung fein verrieben. Nach sorgfältiger Homogenisation wurde die betreffende Mykobakteriensuspension mit weiteren 5 ml Puffer verdünnt und zur Abtötung der Mykobakterien für 30 Min. in ein Wasserbad von 80°C verbracht.

Die so hergestellten (konzentrierten) Antigene wurden bis zum Verbrauch im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt und spätestens 6 Tage nach ihrer Herstellung weiterverarbeitet.

Für die Immunisierung der Kaninchen wurden die konzentrierten Mykobakteriensuspensionen ca. 30 Min. bei 3000 U/Min. zentrifugiert, um auf diese Weise das in der Pufferlösung enthaltene Phenol zu entfernen. Anschließend wurde das Sediment solange mit einer physiologischen

Kochsalzlösung (pH 7,0) verdünnt, bis ein Trübungsgrad erreicht war, der mit einer frisch hergestellten Bariumsulfatlösung von 98 : 2 (98 Teile H_2SO_4 und 2 Teile $BaCl_2$) übereinstimmte (HALLMANN et al., 17).

e) Immunisierungsverfahren

Die Durchführung der Immunisierungen erfolgte bei insgesamt 68 Kaninchen, die wiederum in 3 Versuchsgruppen unterteilt wurden.

Die Versuchsgruppe I bestand aus 53 Tieren, die nach dem von SCHAEFER (55) angegebenen Verfahren immunisiert wurden. Das Antigen wurde den Tieren im Abstand von jeweils 2 - 3 Tagen in die Ohrvene injiziert. Die Tiere wurden jeweils 6 - 7 Tage nach der letzten Immunisierung entblutet.

Nähere Einzelheiten zur Immunisierung innerhalb der Versuchsgruppe I sind in der Tabelle 10 zusammengestellt. Kaninchen Nr. 45 erhielt, abweichend von allen übrigen Tieren dieser Versuchsgruppe das Antigen i.m. (Oberschenkelmuskulatur) verabreicht.

Tabelle 10: Immunisierung der Versuchsgruppe I (Dosisangaben in ml)

Kaninchen Nr.	immunisiert mit Stamm	Zahl der Immunisierungen							
		1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
1	I 15769	1,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
2	I 16909	1,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
3	II 2 6194	1,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
4	II 2 14141	1,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
5	II 3 Cardiff	1,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
6	II 3 577	1,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
7	III a 16020	1,0	2,0	2,0	2,0 +				
8	III a Iowa	1,0	2,0	2,0	2,0 +				
9	III b 14604	1,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
10	III b Vitoch	1,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
11	IV 13528	1,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
12	IV P 55	1,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
13	V 4443	1,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
14	V 25546	1,0	2,0	2,0	2,0	2,0 +			
15	VI 34540	1,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
16	VI 12315	1,0	2,0	2,0	2,0 +				
17	Davis SgB	1,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
18	Davis 14658	1,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
19	Watson 17584	1,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
20	Watson 6450	1,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
21	I 15769	1,0	1,5	2,0	2,0	2,0 +			
22	I 15769	1,0	1,5	2,0	2,0	2,0 +			
23	III a 16020	1,0	1,5	2,0	2,0	2,0 +			
24	III a 16020	1,0	1,5	2,0	2,0	2,0 +			
25	III a Iowa	1,0	1,5	2,0	2,0	2,0 +			
26	III a Iowa	1,0	1,5	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
27	V 25546	1,0	1,5	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
28	V 25546	1,0	1,5	2,0	2,0	2,0 +			
29	VI 12315	1,0	1,0	1,5 +					
30	VI 12315	1,0	1,5	2,0	2,0	2,0 +			
31	VI 12315	1,0	1,5	1,5	1,5	2,0 +			
32	I 15769	0,5	0,5	1,0	1,5	1,0 +			
33	I 15769	0,5	0,5	1,0	1,5	1,0 +			
34	III a 16020	0,5	0,5	1,0	1,0	0,5 +			
35	III a 16020	0,5	0,5	1,0	1,0	1,0	1,0	2,0	2,0
36	I 15769	1,0	1,0	1,5	2,0	1,5 +			
37	I 15769	1,0	1,5	2,0	1,0	entblutet,	da krank		
38	IV P 55	1,0	1,5	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
39	IV P 55	1,0	1,5	2,0	2,0	2,0 +			
40	VI 12315	1,0	1,5	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
41	VI 12315	1,0	1,5	2,0	2,0	2,0 +			
42	Davis SgB	1,0	1,5	1,5	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
43	Davis SgB	1,0	1,5	2,0	2,0	2,0 +			
44	I 16909	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0 +		
45*	I 16909	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
46	II 2 14141	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
47	II 2 6194	2,0	2,0	2,0	1,5	2,0	2,0	2,0	2,0
48	II 3 577	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
49	IV 13528	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
50	VI 12315	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0 +		
51	Davis SgB	2,0	1,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0 +	
52	Davis 14658	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0 +	
53	Watson 6450	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0 +			

+ = intercurrent gestorben

* = Tier wurde i.m. immunisiert

Versuchsgruppe II bestand aus 10 Kaninchen, die in 2 Versuchsreihen eingeteilt wurden. Allen Tieren wurde das Antigen in einer Aufschwemmung von Paraffinum liquidum (als Adjuvans) i.m. in die Oberschenkelmuskulatur injiziert. Die Dosis betrug bei jeder Injektion jeweils 10 mg Bakterien/ml; die Antigene waren 30 Min. bei 80°C abgetötet worden.

Die Kaninchen der Versuchsreihe 1, Nr. 54 bis 58, wurden 7 mal, die Tiere der Versuchsreihe 2, Nr. 59 bis 63, insgesamt 12 mal im Abstand von jeweils 2 Tagen immunisiert. Die Tiere wurden 10 Tage nach der letzten Injektion entblutet.

Weitere Angaben zur Immunisierung der Versuchsgruppe II sind in Tabelle 11 zusammengestellt.

Tabelle 11: Immunisierung der Versuchsgruppe II (Dosisangaben in ml)

Kan. Nr.	immunisiert mit Stamm	Zahl der Immunisierungen											
		1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
54	I 15769	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0				
55	I 15769	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0				
56	I 15769	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	entblutet			
57	I 15769	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0				
58	I 15769	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0				
59	II 2 14141	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
60	II 2 14141	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	+						
61	II 2 14141	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
62	II 2 14141	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
63	II 2 14141	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

+ = intercurrent gestorben

In der Versuchsgruppe III wurde ein weiteres Antigen von *M. avium*, Serotyp II 2 verwendet. Dieser Stamm war im Institut im Rahmen der Mykobakteriendiagnostik aus einem an Tuberkulose verendeten Kranich isoliert und biochemisch und serologisch als *M. avium*, Serotyp II 2 identifiziert worden.

5 Kaninchen wurde das Antigen im Abstand von je 2 Tagen i.m. verabreicht. Als Antigen diente eine hitzeabgetöte Suspension von 10 mg Bakterientrockenmasse in 1 ml Paraffinum liquidum. Nach der 4. Injektion starb ein Kaninchen (Nr. 66). Bei den übrigen 4 Tieren wurde 5 Wochen lang wöchentlich einmal Blut zur Probeagglutination entnommen (siehe C I.1.f). 5 Wochen nach der 4. Injektion wurden Kaninchen Nr. 64 und 65 noch einmal i.m. immunisiert, Kaninchen Nr. 64 mit 10 mg abgetöteter Bakterien in 1 ml Paraffinum liquidum, Kaninchen Nr. 65 mit 100 mg abgetöteter Bakterien in 1 ml Paraffinum liquidum. Kaninchen Nr. 67 und Nr. 68 wurden 75 Tage nach der 4. Injektion mit je 1 ml Antigen, bestehend aus 50 mg wässriger, abgetöteter Bakteriensuspension infiziert. Diese beiden Tiere wurden nach einer weiteren Probeagglutination 50 Tage nach der letzten Injektion wegen ihres schlechten Gesundheitszustandes (Abmagerung) entblutet.

Tabelle 12: Immunisierung der Versuchsgruppe III
(Dosisangaben in ml)

Kaninchen Nr.	immunisiert mit Stamm	Zahl der Immunisierungen				
		1.	2.	3.	4.	5.
64	II 2 1977	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
65	II 2 1977	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
66	II 2 1977	1,0	1,0	1,0	1,0	+
67	II 2 1977	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
68	II 2 1977	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

+ = intercurrent gestorben

f) Blutentnahme und Serumgewinnung

Für die Probeagglutination während der Immunisierung wurden 2 - 3 ml Blut aus der Ohrvene entnommen, die mit einer Haemostilette punktiert worden war.

Nach Abschluß der Immunisierungsversuche erfolgte die Gewinnung von Blut entweder durch Herzpunktion oder nach Betäubung der Tiere durch Anschneiden der Vena jugularis. Das Blut wurde in Zentrifugenröhrchen aufgefangen und zur Koagulation 1 Tag im Kühlraum bei 4°C gelagert. Am folgenden Tag wurden die geronnenen Blutproben, nachdem der Blutkuchen mit Hilfe eines Glasstabes vorsichtig vom Röhrchenrand gelöst worden war, 15 Minuten lang bei 3000 U/Min. zentrifugiert. Das gewonnene Serum wurde zur Konservierung mit einer 5 %igen wässrigen Phenollösung im Verhältnis 1:10 versetzt, was einer Endkonzentration von 0,5 % Phenol entsprach. Die konservierten Seren wurden bis zum Gebrauch in mit Gummistopfen verschlossenen Reagenzröhrchen im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

g) Antikörperbestimmung in der Langsamagglutination

Jedes neu gewonnene Serum wurde in der Langsamagglutination nicht nur gegen sein homologes Antigen sondern auch gegen die übrigen 19 Antigene geprüft. Zu diesem Zweck wurden pro Serum 20 Verdünnungsreihen jeweils von 1:10 bis 1:5120 angesetzt. Die Verdünnung der Seren erfolgte mit Phosphatpuffer-NaCl-Gebrauchslösung (siehe unter C, I. 1 c). Die Menge der jeweiligen Serumverdünnung betrug 0,5 ml. Zu den einzelnen Serumverdünnungen der 20 Verdünnungsreihen wurden dann die entsprechenden Antigene ebenfalls in einer Menge von 0,5 ml hinzugegeben. Als Kontrolle diente ein Gemisch von 0,5 ml des jeweiligen Antigens und 0,5 ml der Pufferlösung.

Die Röhrchen mit dem Serum-Antigen-Gemisch wurden vorsichtig geschüttelt und anschließend im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die erste Ablesung der Agglutinationsreaktion erfolgte 5 Stunden, die zweite Ablesung 24 Std. nach Versuchsansatz. Sie wurde bei Tageslicht mit bloßem Auge vorgenommen. Der Reaktionsausfall wurde stets im Vergleich zur mitgeführten Antigenkontrolle wie folgt beurteilt: vollständige Klärung des Überstandes mit +++, 30 bis 75 % Klärung des Überstandes mit ++, deutliche Trübung der überstehenden Flüssigkeit mit + und völlige Trübung des Überstandes (identisch mit der Trübung der Antigenkontrolle) als negativ.

Als Endtiter wurde die letzte Verdünnungsstufe angesehen, bei der noch eine Klärung des Überstandes von ++ zu beobachten war. Als Gebrauchstiter wurde die Serumverdünnung gewählt, die möglichst hoch war und bei der auch der zweite Stamm des homologen Typs noch mitreagierte. Ein Serum wurde nur dann als typenspezifisch angesehen, wenn es mit den beiden Antigenen des betreffenden homologen Serotyps reagierte. In der gleichen Titerhöhe durfte aber keine Reaktion mit heterologen Serotypen vorhanden sein.

h) Immunfluoreszenz

Für die immunfluoreszenzserologischen Untersuchungen wurden die Seren der Kaninchen Nr. 1, 3, 42 und 49 verwendet. Diese Tiere waren mit den Serotypen I, II 2, IV und Davis immunisiert worden (Tabelle 10).

Die Konjugate wurden in Anlehnung an die von FEY (14) entwickelte Methode hergestellt. Zur Gewinnung der Globulinfraktion wurden bei 4°C (Kühlraum) 20 ml Vollserum tropfen-

weise unter ständigem Rühren (mit Hilfe eines Magnetrührers) 20 ml einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung zugesetzt. Dieses Gemisch wurde über Nacht bei der gleichen Temperatur (4°C) weitergerührt. Am folgenden Tag wurde die Mischung 45 Minuten lang bei 4500 U/Min. in der Kühlzentrifuge (Christ, Typ UJ 1 KS) zentrifugiert. Das Sediment wurde anschließend zweimal mit 40 %iger Ammoniumsulfatlösung gewaschen und dann in 2 ml physiologischer NaCl-Lösung aufgenommen. Die so gewonnene Globulinfraktion wurde solange gegen physiologische NaCl-Lösung dialysiert, bis mit Hilfe von BaCl_2 -Reagenz keine Sulfationen mehr nachgewiesen werden konnten. Anschließend wurde die Proteinkonzentration mittels Biuretreaktion bei 546 nm im Eppendorf-Photometer bestimmt. Als Standard diente eine 3 %ige wässrige Albuminlösung (Albumin bovine plasma fraction V der Armour Laboratories, Chicago, Illinois).

Danach wurde mit physiologischer NaCl-Lösung die Globulinlösung auf einen Proteingehalt von 2 %, mit 0,5 M Carbonat-Bicarbonatpuffer der pH-Wert auf 9,7 eingestellt. Zur Konjugation wurde für 50 mg Globulin 1 mg Fluoresceinisothiocyanat (FITC der Fa. BBL, Baltimore) verwendet. Die entsprechende Menge FITC wurde in einen Erlenmeyerkolben eingewogen, die Globulinlösung auf einmal unter Rühren (Magnetrührer) bei 4°C hinzugegeben und über Nacht im Kühlraum weitergerührt.

Der nach der Konjugation noch vorhandene ungebundene Farbstoff wurde mittels Gelchromatographie an einer Sephadex G 50 (coarse) Säule entfernt. Nach Äquilibration der Säule mit einem 0,01 M PBS-Puffer, pH 8,0, wurde das Konjugat auf das Gel pipettiert und solange eluiert, bis es vollständig in die Säule eingedrungen war. Anschließend wurde das Sephadex-Gel mit 0,01 M PBS-Puffer (pH 8,0) überschichtet.

Zuerst wurde die im Molekulargewicht größere konjugierte Fraktion eluiert, danach der nicht gebundene überschüssige Farbstoff. Von dem in mehreren Röhrchen aufgefangenen Konjugat wurden der schwach gelb gefärbte Vor- und Nachlauf verworfen; nur mit dem mittleren, stark konjugierten Anteil wurde weitergearbeitet.

Zur Überprüfung der Spezifität der Konjugate wurden Objektträgerausstriche von den homologen Bakterienstämmen angefertigt. Die hitzefixierten Ausstriche wurden mit einigen Tropfen des entsprechenden Konjugats überschichtet. Die Färbezone wurde mit einem Diamantschreiber auf dem Objektträger markiert. Die Präparate wurden 30 - 60 Minuten lang in einer feuchten Kammer bei Zimmertemperatur gefärbt, anschließend vorsichtig mit PBS (pH 8,0) abgewaschen, zweimal für je 5 Minuten in PBS, pH 8,0, gewässert und luftgetrocknet. Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden die derart behandelten Präparate unter Deckglas in PBS-gepuffertes Glycerin eingebettet.

Die mikroskopische Untersuchung erfolgte in einem Fluoreszenzmikroskop der Fa. LEITZ "Ortholux" mit "Orthomat" (Beleuchtung Philips Quecksilberdampflampe, Filter Blau BG 12) in Auflichtfluoreszenz.

i) Hühnerversuche

Im Laufe der Untersuchungen zeigten einige Referenzstämme zunehmend rauhes Wachstum. Es waren dies die Serotypen I 16909, II 2 6194, II 2 1977 und II 3 Cardiff. Aus diesem Grunde wurden pro Stamm je zwei 5 Wochen alte Junghühner einer Mastrasse infiziert. Jedem Tier wurde eine lebende wässrige Mykobakterienaufschwemmung i.v. in die Flügelvene injiziert. Ein Tier erhielt eine Bakteriensuspension von 0,5 mg/ml, das andere dagegen nur

0,1 mg/ml des gleichen Stammes. 8 Wochen post infectionem wurden die Tiere entblutet. Die Organe Leber, Milz, Nieren und Lunge wurden zur Rückkultivierung der Stämme sowohl mit als auch ohne H_2SO_4 -Behandlung auf Löwenstein-Jensen- und Middlebrook 7 H 10-Agarröhrchen angelegt.

2. Serotypisierung von aviären Mykobakterienstämmen

a) Bakterienstämme

Zur Untersuchung gelangten 96 Mykobakterienstämme, die im Institut im Rahmen der Mykobakteriendiagnostik aus tuberkulösen Veränderungen von verschiedenen Tieren isoliert oder dem Institut zur genaueren Differenzierung zugesandt worden waren.

Bei 71 Stämmen handelte es sich um Isolate aus Lymphknoten von Rindern. 16 Stämme waren aus Lymphknotenmaterial und 2 Stämme aus Lunge bzw. Leber von Schweinen isoliert worden. Während 2 Kulturen von Hühnern stammten, entfiel auf Habicht, Strauß, Taube, Kranich und Schwan je 1 Stamm. Die Stämme wurden auf Löwenstein-Jensen-Eiernährboden gehalten. Alle Stämme waren auf Grund ihrer kulturellen Eigenschaften sowie ihres Verhaltens in der Amid-Reihe nach BÖNICKE (9), Spaltung von Nicotin- und Pyrazinamid, als aviäre bzw. zum *M. avium*-*M. intracellulare*-Komplex gehörende Mykobakterien differenziert worden.

Für die serologischen Untersuchungen wurden die betreffenden Kulturen auf Middlebrook 7 H 10 Agarplatten überimpft und ca. 3 Wochen in feuchter Kammer bei $37^{\circ}C$ bebrütet. Glatte opake Einzelkolonien wurden anschließend auf Middlebrook 7 H 10-Schrägagaröhrchen abgeimpft.

b) Herstellung der Bakteriensuspension

Für die Langsamagglutination kamen Suspensionen nur von glatt wachsenden Mykobakterien in Frage. Die Herstellung der Bakteriensuspensionen war die gleiche wie unter C I. 1 d) beschrieben. Abweichend hiervon wurden die Antigene mit der Puffer-Gebrauchslösung so weit verdünnt, bis ein Trübungsgrad erreicht war, der mit einer frisch hergestellten Bariumsulfatlösung von 97 : 3 (97 Teile H_2SO_4 und 3 Teile $BaCl_2$) übereinstimmte. Diese Trübung - Röhrchen 3 nach McFARLAND (17) - entspricht einer ungefähren Bakteriendichte von 900 Keimen/ml.

c) Agglutinationsverfahren

Die zu untersuchenden Stämme stellten die Antigene dar. Jedes Antigen wurde mit den 20 selbst hergestellten typhenspezifischen Antiseren in deren Gebrauchsverdünnung angesetzt. Zu diesem Zwecke wurden in Agglutinationsröhrchen, die 0,5 ml Serum der jeweiligen Gebrauchsverdünnung enthielten, die gleichen Mengen der zu untersuchenden Bakteriensuspensionen einpipettiert. Als Kontrolle diente für jedes Antigen ein Röhrchen mit je 0,5 ml Bakteriensuspension und 0,5 ml Phosphatpuffer-NaCl-Lösung. Nach vorsichtigem Schütteln wurde das Serum-Antigen-Gemisch im Brutschrank bei $37^{\circ}C$ inkubiert. Die erste Ablesung erfolgte 5 Stunden und die zweite Ablesung 24 Std. nach Versuchsansatz. Die Beurteilung des Reaktionsausfalles der Langsamagglutination wurde wie unter C I. 1 g) beschrieben vorgenommen.

II. Ergebnisse

1. Herstellung typenspezifischer Antiseren

Kaninchen

Zur Herstellung von 20 typenspezifischen Antiseren wurden insgesamt 68 Kaninchen benötigt. 27 Tiere starben intercurrent, während ein Tier wegen seines schlechten Allgemeinbefindens vorzeitig getötet werden mußte. Die intercurrenten Todesfälle traten ausnahmslos 2 - 3 Stunden nach einer verabreichten Injektion ein. Bei einem Tier war dies die dritte Immunisierung, bei je 2 Tieren die 6. und 7., bei 4 Tieren die 4. und bei 18 Tieren die 5. Immunisierung. Von diesen 27 gestorbenen Tieren und auch von dem getöteten Kaninchen konnten keine Blutproben zur Serumgewinnung entnommen werden.

Die Ergebnisse der Austitrierung der 40 gewonnenen Seren sind in Tabelle 13 wiedergegeben. In dieser tabellari-schen Zusammenstellung ist der Endtiter eines jeden Serums gegen seine homologen Antigene sowie der höchste Titer gegen ein heterologes Antigen aufgeführt. Der Gebrauchstiter wurde unter Berücksichtigung der Kreuzreaktionen mit heterologem Antigen festgelegt. Aus diesem Grunde waren die Serumproben von nur 23 Kaninchen für eine Serotypisierung von aviären Mykobakterien brauchbar. Die restlichen 17 Seren zeigten entweder zu hohe unspezifische Kreuzreaktionen (Seren Nr. 4, 11, 17, 45, 46, 47, 48, 56, 57, 58, 59) oder mit homologen Antigenen zu niedrige Endtiter (Seren Nr. 62, 63, 64, 65, 67, 68).

Ferner gelang es mit keinem der 4 Konjugate, die aus den Seren 1, 3, 42 und 49 hergestellt worden waren, in den angefertigten Präparaten spezifisch fluoreszierende Mykobakterien nachzuweisen.

Tabelle 13: Ergebnisse der Auswertung von Immunseren

Serum von Kaninchen	immunisiert mit Stamm	Art d. Imm.	Endtiter mit homologem Ag	Titer mit heterolog. Ag	Gebrauchs- titer
1	I 15769	i.v.	160	40	80
2	I 16909	i.v.	80	40	60
3	II 2 6194	i.v.	160	80	100
4	II 2 14141	i.v.	40	80	--
5	II 3 Cardiff	i.v.	80	40	60
6	II 3 577	i.v.	160	80	100
9	III b 14604	i.v.	640	80	160
10	IIIb Vitoch	i.v.	640	80	160
11	IV 13528	i.v.	640	160	--
12	IV P 55	i.v.	160	80	100
13	V 4443	i.v.	160	80	100
15	VI 34540	i.v.	320	80	100
17	Davis SgB	i.v.	160	160	--
18	Davis 16584	i.v.	80	40	60
19	Watson 17584	i.v.	160	80	100
20	Watson 6450	i.v.	320	80	100
26	III a Iowa	i.v.	320	80	100
27	V 25546	i.v.	160	40	80
35	III a 16020	i.v.	320	80	100
38	IV P 55	i.v.	160	80	100
40	VI 12315	i.v.	160	40	80
42	Davis SgB	i.v.	160	80	100
45	I 16909	i.m.	320	160	--
46	II 2 14141	i.v.	320	160	--
47	II 2 6194	i.v.	80	160	--
48	II 3 577	i.v.	160	160	--
49	IV 13528	i.v.	320	80	100
54	I 15769	i.m.	80	40	60
55	I 15769	i.m.	160	80	100
56	I 15769	i.m.	80	80	--
57	I 15769	i.m.	320	320	--
58	I 15769	i.m.	80	80	--
59	II 2 14141	i.m.	20	80	--
61	II 2 14141	i.m.	80	40	60
62	II 2 14141	i.m.	40	20	--
63	II 2 14141	i.m.	20	20	--
64	II 2 1977	i.m.	10	-	--
65	II 2 1977	i.m.	10	-	--
67	II 2 1977	i.m.	20	20	--
68	II 2 1977	i.m.	40	20	--

Die Titerangaben stellen reziproke Werte dar.

-- = Eine Gebrauchstitereinstellung war infolge hoher Kreuzreaktionen mit heterologen Antigenen oder infolge eines zu niedrigen Endtiters gegen das homologe Antigen nicht möglich.

Hühnerversuche

Die Untersuchungsergebnisse der durchgeführten Hühnerversuche sind in einer tabellarischen Zusammenstellung (Tabelle 14) wiedergegeben. Alle Hühner wurden 8 Wochen post infectionem in einem guten Ernährungszustand getötet. Anhand der pathologisch-anatomischen Befunde konnten zwischen Tieren, die 0,1 mg lebende Mykobakterien und denen, die die fünffache Dosis erhalten hatten, keine auffallenden Unterschiede festgestellt werden. Aus den veränderten Organen der Hühner 1, 2, 5, 6, 7 und 8 konnten Mykobakterien kulturell nicht reisoliert werden. Nur aus den Organen von Huhn Nr. 3 und Nr. 4 gelang es, Mykobakterien anzuzüchten. Die reisolierten Stämme zeigten aber ein rauhes Wachstum und konnten zur Antigenherstellung nicht verwendet werden.

Versuchsweise wurden auch die Seren aller Hühner auf Antikörper untersucht. Die Austitrierung der gewonnenen Hühnerseren erbrachte aber, wie auch aus Tabelle 14 ersichtlich, keine für die Serotypisierung brauchbaren Antiseren. Während bei 2 Tieren (Huhn Nr. 2 und Nr. 7) die Titer der Kreuzreaktionen auf gleicher Höhe mit dem Endtiter des homologen Antigens lagen, war bei einem Tier (Huhn Nr. 8) der spezifische Titer mit 1:40 zu niedrig. Seren von den übrigen 5 Tieren (Huhn Nr. 1, 3, 4, 5 und 6) zeigten mit heterologen Antigenen einen höheren Titer als mit der homologen Mykobakteriensuspension.

Tabelle 14: Zusammenstellung von Ergebnissen der Infizierungsversuche bei Hühnern

Fuhn Nr.	infiziert mit Stamm	Dosis	Endtiter m. homolog.Ag	Titer mit heterol.Ag	Leber	pathologisch-anatomische Befunde Milz	Lunge	Nieren	kulturelle Untersuchung
1	I 16909	0,5 mg	neg.	20	o.b.B.	o.b.B.	vereinzelte miliare Herde	o.b.B.	negativ
2	I 16909	0,1 mg	80	80	o.b.B.	o.b.B.	vereinzelte miliare Herde	o.b.B.	negativ
3	II2 6194	0,5 mg	20	80	Schwell- lung	Schwell- lung	einzelne miliare Herde	o.b.B.	positiv
4	II2 6194	0,1 mg	neg.	80	o.b.B.	o.b.B.	o.b.B.	o.b.B.	positiv
5	II2 1977	0,5 mg	10	40	vereinzelte miliare Herde	vereinzelte miliare Herde	o.b.B.	o.b.B.	negativ
6	II2 1977	0,1 mg	20	40	vereinzelte miliare Herde	vereinzelte miliare Herde	o.b.B.	o.b.B.	negativ
7	II3 Cardiff	0,5 mg	20	20	zahlreiche miliare Herde	o.b.B.	vereinzelte miliare Herde	o.b.B.	negativ
8	II3 Cardiff	0,1 mg	40	20	vereinzelte miliare Herde	o.b.B.	o.b.B.	o.b.B.	negativ

Die Titerangaben stellen reziproke Werte dar.

2. Serotypisierung von aviären Mykobakterienstämmen

Von 96 untersuchten aviären Mykobakterienstämmen konnten mit den zur Verfügung stehenden Seren 80 Stämme (= 83 %) einem Serotyp des M. avium-M. intracellulare-Komplexes zugeordnet werden. Am häufigsten wurde M. avium Serotyp II 2 bei 56 Stämmen nachgewiesen, dann folgte M. avium Serotyp I bei 12 Stämmen. 5 Stämme entfielen auf M. intracellulare Serotyp Davis, 3 Stämme auf M. intracellulare Serotyp IV, 2 Stämme auf M. intracellulare Serotyp VI und 1 Stamm auf M. avium Serotyp II 3. Weiterhin konnte ein Doppelserotyp II2/II3 von M. avium gefunden werden. Während 1 Stamm (isoliert vom Schwein) mit den Seren vom Typ III b und IV gleichermaßen schwach reagierte, zeigten 5 Stämme mit den von mir hergestellten Antiseren keinerlei Reaktion. Weitere 10 Stämme konnten infolge Spontanagglutination ebenfalls nicht serotypisiert werden.

In Tabelle 15 sind die Ergebnisse der Serotypisierungen für die einzelnen Tierarten (Rind, Schwein und Geflügel) zusammengestellt. In der tabellarischen Übersicht sind die Serotypen sowohl in der alten (SCHAEFER) als auch in der neuen Bezeichnung (THOEN) aufgeführt (s. auch Tabelle 3).

Tabelle 15: Ergebnisse der Serotypisierung von aviären Mykobakterien isoliert von Rindern, Schweinen und Geflügel

Serotyp		Zahl der Stämme			
alte Bez.	neue Bez.	Rind	Schwein	Geflügel	insgesamt
<u>M.avium</u>					
I	1	11	1	0	12
II 2	2	42	9	5	56
II 3	3	1	0	0	1
II 2/II 3	2/3	1	0	0	1
<u>M.intracellulare</u>					
IV	4	2	0	1 ⁺	3
VI	6	2	0	0	2
Davis	8	1	3	1 ⁺⁺	5
nicht typisierbar		11	5	0	16
Gesamtzahl der untersuchten Stämme		71	18	7	96

+ = Isolat vom Huhn

++ = Isolat vom Habicht

D. Diskussion

I. Herstellung von Immunseren

Der Erfolg einer serologischen Typisierung von Bakterienstämmen hängt in erster Linie davon ab, ob es gelingt, hochtitrige und spezifisch reagierende Immunseren herzustellen. Hierzu benötigt man wiederum spezifisch antigen wirkende Bakterienstämme. Nach Untersuchungen von ANZ (4), KRAUSE (30) sowie SCHAEFER et al. (59) steht die Virulenz von Mykobakterien in engem Zusammenhang mit der Kolonieform, denn rauh wachsende Stämme zeigten im Tierversuch stets die stärkste Pathogenität. Dagegen sind Rauhformen für die Serotypisierung ungeeignet, weil sie zu Spontanagglutinationen neigen.

Nach Untersuchungen von MARTINS et al. (36) spielt sogar das Verfahren der Aufarbeitung von Bakterienstämmen, die als Antigene zur Immunisierung verwendet werden sollen, eine nicht unerhebliche Rolle für deren Brauchbarkeit. Die Autoren töteten die Mykobakterien mit Hilfe von UV-Strahlen ab und erhielten mit derart hergestellten Antigenen besonders spezifisch reagierende Immunseren. Durch Hitze abgetötete Mykobakteriensuspensionen erbrachten dagegen in ihren Versuchen Immunseren, die mit heterologen Stämmen starke Kreuzreaktionen zeigten.

Auch in meinen Untersuchungen konnte ich Ähnliches beobachten. Mehrere meiner Immunseren, die sämtlich mit hitzeabgetöteten Mykobakterien hergestellt worden waren, zeigten z. T. erhebliche unspezifische Kreuzreaktionen (siehe Tabelle 13). Der Titer mit heterologen Antigenen war in manchen Fällen gleich oder nur eine Serumverdünnung niedriger als der Endtiter mit den betreffenden homologen Antigenen.

Nach ANZ et al. (2) muß bei der Immunisierung mit abgetöteten Mykobakterienaufschwemmungen eine Titereinbuße in Kauf genommen werden. Nicht abgetötete *M. avium*-Stämme jedoch führen häufig zum vorzeitigen Tod der Kaninchen infolge septikämischer Verlaufsformen; deshalb ist für die Immunserumherstellung eine Verabreichung abgetöteter Mykobakteriensuspensionen vorzuziehen. Bei *M. intracellulare*-Stämmen können außerdem allergische Reaktionen zu spontanen Todesfällen führen.

Diese von ANZ et al. (2) gemachten Beobachtungen traten auch in meinen Untersuchungen auf. Von 27 intercurrent gestorbenen Kaninchen waren 8 Tiere mit abgetöteten *M. avium*-Stämmen und 18 Kaninchen mit abgetöteten *M. intracellulare*-Suspensionen immunisiert worden. Die Sektion ergab bei all diesen Tieren das Vorliegen von ausgeprägten Lungenveränderungen. Bei 3 der verendeten Tiere wurde zusätzlich eine histologische Untersuchung durchgeführt. Sie ergab bei allen Tieren das Vorliegen ausgeprägter Lungenveränderungen. Eine eindeutige Aussage über die Pathogenese dieser Lungenprozesse konnte nicht getroffen werden, jedoch ließen sich allergische Ursachen nicht ausschließen¹⁾.

Der Tod der Kaninchen trat in allen Fällen 2 - 3 Stunden nach der zuletzt verabreichten Injektion auf und zwar fast regelmäßig nach der 4., 5. bzw. 6. Immunisierung. Auch aus diesem Grunde ist eine übermäßige Sensibilisierung der Tiere als Todesursache nicht auszuschließen.

Unter den 27 intercurrent gestorbenen Kaninchen befanden sich nur 2 Tiere, die i.m. infiziert worden waren. Die

1) Für die Durchführung der histologischen Untersuchungen und Überlassung der Befunde danke ich den Mitarbeitern des Veterinär-Pathologischen Institutes der Universität Giessen (Direktor: Prof. Dr. E. Weiss).

Befunde zeigen, daß die Gefahr einer allergischen Reaktion, die zum Tode führt, bei einer intravenösen Verabreichung des Antigens wesentlich höher ist als bei der intramuskulären Immunisierung.

SCHAEFER (55) beschrieb erstmals das Verfahren zur Herstellung von brauchbaren Immunseren. Aus den zahlreichen Veröffentlichungen (7, 11, 16, 18, 19, 34, 36, 81), in denen die von SCHAEFER empfohlene Methode in jeder Beziehung variiert wird, kann man ersehen, daß man sich über das optimale Verfahren zur Herstellung hochwertiger Immunseren noch nicht im klaren ist. In vorliegenden Untersuchungen ergaben die intravenösen Immunisierungen gegenüber den intramuskulären stets höhertitrige Seren. Die i.m. Immunisierung erbrachte nur Seren mit niedrigen Titern gegenüber den homologen Antigenen (Tabelle 13).

Auch wurde versucht, bei letzterem Immunisierungsverfahren durch Zugabe eines Adjuvans Seren mit evtl. höheren Titern zu erreichen. Bei Immunisierungsversuchen mit Mykobakterien kann aber ein komplettes Freund'sches Adjuvans infolge seines Gehaltes an *M. butyricum* nicht eingesetzt werden. Aus diesem Grunde verwendete ich stattdessen Paraffinum liquidum. Von den 15 auf diese Weise immunisierten Kaninchen konnten trotzdem nur 3 brauchbare Seren (Kaninchen Nr. 54, 55, 61) gewonnen werden.

In einer Versuchsgruppe (Kaninchen Nr. 64 bis 68) wurde das Antigen im Abstand von je 2 Tagen insgesamt viermal verabreicht (i.m.). In jeweils einwöchigen Abständen wurden nach der 4. Immunisierung mit dem Serum der betreffenden Tiere 5 Probeagglutinationen durchgeführt. Zwei Wochen nach der letzten Immunisierung zeigten die Seren die höchsten Titer (1:80 Kaninchen 66, 1:160 Kaninchen 64 und 1:320 Kaninchen 65, 67 und 69). Anschließend wurde

bei allen Tieren ein Titerabfall um eine Stufe beobachtet. Eine erneute Immunisierung 5 Wochen (Kaninchen Nr. 64 und 65) bzw. 75 Tage (Kaninchen Nr. 67 und 68) nach der 4. Injektion erbrachte in keinem Falle einen nachweisbaren Titeranstieg gegenüber der letzten Probeagglutination.

Zu ähnlichen Ergebnissen kam RÖDER (51) in seinen Untersuchungen. Er erzielte mit 6 Injektionen bereits einen Titerwert, der trotz weiterer Immunisierungen nicht mehr höher anstieg.

BENNEDSEN (7) fand bei seinen Untersuchungen, daß die zu Beginn einer Infektionsperiode gebildeten Antikörper gegen homologe Mykobakterienantigene besonders spezifisch reagierten. Aus diesem Grunde immunisierte (i.v.) er seine Kaninchen nur einmal. So erhielt er Seren mit einem Titer von ca. 1:300, die außerdem keine Kreuzreaktionen mit heterologen Mykobakterienstämmen zeigten.

Mykobakterienstämmen können durch viele Passagen auf festen Nährböden evtl. ihre Virulenz verlieren. Deshalb wurde der Stamm II 2 1977 zusätzlich zu den bereits verwendeten 20 SCHAEFER-Stämmen mit in die Untersuchungen zur Immunserumherstellung bei Kaninchen Nr. 64 bis 68 einbezogen. Es handelte sich hierbei um eine frisch isolierte Kultur, die bis zu diesem Zeitpunkt nur wenig passagiert worden war. Auch mit diesem Stamm konnten keine besseren Immunseren gewonnen werden (Tabelle 13).

Auch die Infizierung von Hühnern mit rauh wachsenden Stämmen erbrachte keine hochtitrigen Immunseren (Tabelle 14). Im Gegenteil zeigten die Seren z. T. mit heterologen Antigenen höhere Titerwerte als mit homologen Suspensionen. Die Hühner, die mit lebenden Mykobakterienkulturen infiziert worden waren, wurden 8 Wochen post infectionem in

einem guten Ernährungszustand getötet. Nur bei 2 Tieren (Huhn Nr. 3 und 4, infiziert mit Stamm II2 6194) verliefen die kulturellen Isolierungsversuche positiv. Aus den Organen der übrigen Hühner konnten dagegen Mykobakterien nicht mehr reisoliert werden (Tabelle 14). Diese Untersuchungsergebnisse waren insofern unerwartet, da *M. avium*-Stämme vom Serotyp II in der Regel als hühnerpathogen angesehen werden. Außerdem zeigten alle injizierten Stämme rauhes Wachstum, was nach Untersuchungen von KRAUSE (30) und SCHAEFER (59) ein Kriterium für besondere Pathogenität sein soll, im Gegensatz zu glatt (opak) oder transparent wachsenden Stämmen. Der reisolierte Stamm wuchs ebenfalls wieder in Rauhform. Mit Hilfe eines Tierversuchs können demnach rauhe Varianten nicht in glatte Formen überführt werden, wie dies auch von anderen Autoren beschrieben worden ist (30, 59).

II. Die Brauchbarkeit der Immunfluoreszenz

Eine erfolgreiche Immunfluoreszenzserologie könnte die heute übliche und z. T. sehr aufwendige Mykobakteriendiagnostik wesentlich erleichtern. Es könnte u. U. eine schnelle Typendifferenzierung direkt aus dem Untersuchungsmaterial durchgeführt werden. Auch wäre es mit Hilfe der Immunfluoreszenz möglich, rauh wachsende Stämme serologisch zu typisieren.

Verschiedene Arbeitsgruppen (6, 7, 11, 15, 16, 18, 19, 36, 69, 70) haben bereits immunfluoreszenzserologische Untersuchungen mit Mykobakterien durchgeführt. Dabei berichteten einige Verfasser (v.a. 7, 11, 19, 36) von guten Ergebnissen, die sie mit dieser Methode erzielen konnten. Alle Autoren betonen dabei aber stets die Unerläßlichkeit

des Vorhandenseins spezifischer, nochtitriger Immunseren für die Konjugation. Aus diesem Grunde habe ich in meinen Untersuchungen die 4 besten zur Verfügung stehenden Immunseren konjugiert, deren Serotypen auch von der Häufigkeit ihres Vorkommens in tierischem Untersuchungsmaterial her besonders wichtig zu sein schienen. Es handelte sich hierbei um Seren, die gegen ihre homologen Antigene hohe Titerwerte, gegen heterologe Antigene dagegen relativ niedrige Kreuztiter aufwiesen (Tabelle 13). Es gelang mit keinem der vier hergestellten Konjugate, in angefertigten Präparaten spezifisch fluoreszierende Mykobakterien nachzuweisen. Vermutlich haben die von mir konjugierten Immunseren einen hohen Antikörperverlust erlitten, denn JONES et al. (19) fanden in ihren Untersuchungen, daß der Titer eines Serums nach der Konjugation von 1:2560 auf 1:32 abgefallen war. Meine Seren hatten vor der Konjugation nur Titerwerte von 1:320 (Serum Nr. 49) bzw. 1:160 (Seren Nr. 1, 3, 42).

CHOI et al. (11) führten ihre positiv verlaufenen fluoreszenzserologischen Untersuchungen mit einem Konjugat durch, das einen Titer von mindestens 1:64 aufwies. Nach den Untersuchungsergebnissen von JONES et al. (19) muß hierfür ein Vollserum mit einem Mindesttiter von 1:5120 vorgelegen haben. Die Herstellung solch nochtitriger Immunseren dürfte aber, nach meinen Untersuchungen zu schließen, kein regelmäßiges, sondern mehr ein zufälliges Ergebnis sein.

Es kommt dazu, daß die Beurteilung des Reaktionsausfalles in der Immunfluoreszenz nach bisherigen Literaturangaben ziemlich subjektiv zu sein scheint. So konnte GILMOUR (16) *M. avium*-, *M. paratuberculosis*- und BCG-Stämme nur dann unterscheiden, wenn er den jeweils höchsten Titer

als artspezifisch ansah. Er bezeichnete ebenso wie BENNEDSEN (7) + und ++ - Reaktionen als unspezifisch und beurteilte +++ und ++++ - Reaktionen als spezifisch. SHEPARD und KIRSH (69, 70) sowie GILLISEN (15) und JONES et al. (18) berichten dagegen von störenden Kreuzreaktionen bei konjugierten Seren, die sie nicht ausschalten konnten.

III. Serotypisierung aviärer Mykobakterienstämmen

In der vorliegenden Arbeit sollte außerdem versucht werden, mit den selbst hergestellten Immunsereen in der Langsamagglutination aviäre Mykobakterien von verschiedenen Tierarten (Rind, Schwein, Geflügel) zu typisieren. Die betreffenden Untersuchungen erfolgten in Anlehnung an das von SCHAEFER (54, 55) entwickelte Verfahren.

Von 71 untersuchten Mykobakterienstämmen, die aus tuberkulös veränderten Lymphknoten von Rindern stammten, konnten 11 Stämme dem Serotyp I und 42 Stämme dem Serotyp II 2 von *M. avium* zugeordnet werden. Je 2 Stämme entfielen auf *M. intracellulare* Serotyp IV bzw. VI. *M. avium* Serotyp II 3 und Doppelserotyp II 2/II 3, sowie *M. intracellulare* Serotyp Davis konnten je einmal bestimmt werden. 11 Stämme dagegen konnten in der Agglutination nicht typisiert werden. Von den 60 typisierbaren Rinderstämmen entfielen demnach auf *M. avium* insgesamt 55 Stämme bzw. rund 92 %. Diese Ergebnisse entsprechen in etwa denen der Arbeitsgruppe aus Borstel, die 97 bis 100 % der typisierten Stämme vom Rind den sog. "echten" aviären Mykobakterien zuordnen konnte (1, 2, 39, 45). Diese Stämme kommen fast ausschließlich bei natürlichen Infektionen von Hühnern vor (39).

Vom Schwein standen insgesamt 18 Stämme für die Serotypisierung zur Verfügung. Am häufigsten wurde *M. avium* Serotyp II2 mit 9 Stämmen bestimmt; auf *M. avium* Serotyp I entfiel dagegen nur ein Stamm. Während weitere 3 Stämme *M. intracellulare* Serotyp Davis zugeordnet wurden, konnten 5 Stämme nicht typisiert werden. Auf Grund der geringen Anzahl der untersuchten Schweinestämme kann keine einwandfreie statistische Aussage getroffen werden. Trotzdem stimmen die gefundenen Ergebnisse in etwa mit denen anderer Autoren aus der Bundesrepublik überein, die ca. 70 bis 87 % der bei tuberkulösen Schweinen isolierten und serotypisierten Mykobakterien den *M. avium*-Serotypen I und II zuordnen konnten (1, 2, 45, 72). In meinen Untersuchungen gehörten 56 % der typisierten Stämme zu diesen Serotypen. Für *M. avium* Serotyp I, insbesondere aber für Serotyp II können auf Grund bisheriger Erfahrungen Hühner als Erregerreservoir und Infektionsquelle angesehen werden. In Ländern, in denen die Hühnertuberkulose nicht in dem Ausmaß verbreitet ist wie in der Bundesrepublik, werden tuberkulöse Veränderungen beim Schwein häufig durch andere Serotypen hervorgerufen. In Südafrika finden sich bei Schweinen hauptsächlich die Serotypen III a, IV und Davis (KLEEGERG et al., 29), in Australien stehen die Serotypen VII und Altmann im Vordergrund. In Westdeutschland dagegen beträgt der Anteil dieser Serotypen aus tuberkulösen Veränderungen des Schweines nur ca. 20 % (45, 72). Nach Untersuchungen von KLEEGERG und NEL (29) haben diese "intermediären Typen" (nach MEISSNER, 39) ihren Standort vornehmlich im Boden, in Staub, Sägespänen oder Futtermitteln.

Vom Geflügel wurden alle 7 untersuchten Stämme serotypisiert. *M. avium* Serotyp II2, der auch als hühnerpathogen gilt, wurde 5 mal bestimmt, daneben je einmal *M. intra-*

cellulare Serotyp IV und Davis. Auch hier läßt die geringe Anzahl der untersuchten Stämme keine einwandfreie statistische Aussage zu. Bemerkenswert ist, daß auch ANZ et al. (1, 2) sowie PIENING et al. (45) über das Vorkommen von M. intracellulare Serotyp IV bzw. Davis beim Geflügel berichten, obwohl diese Serotypen als nicht hühnervirulent angesehen werden (MEISSNER, 39). ANZ und MEISSNER (4) konnten aber in experimentellen Untersuchungen nachweisen, daß sog. "smooth-transparente" (translucent) = T-Kolonien vom Serotyp Davis für Hühner virulent sein können, nicht dagegen die "smooth-opaquen" (domed) = D-Kolonien. So gesehen können also auch Vögel als Reservoir für die sog. "intermediären" Stämme in Frage kommen.

Für die Zuordnung von aviären Mykobakterien zu M. avium oder M. intracellulare war bis vor kurzem der Tierversuch am Huhn maßgebend. Die Virulenz der Mykobakterienstämme ist sowohl von der Kolonieform (glatt oder rauh) als auch von der Infektionsdosis abhängig. Besonders bei Stämmen aus der M. intracellulare-Gruppe ist dies von nicht unerheblicher Bedeutung. Virulenzversuche an Hühnern haben deshalb im Vergleich zur Serotypbestimmung nur einen beschränkten Aussagewert. Außerdem ist für das Studium epidemiologischer Zusammenhänge bei Mykobakteriosen die Serotypisierung bei aviären Mykobakterien eine wertvolle Hilfe. Auf diese Weise können mögliche Infektionsquellen oder Infektketten aufgeklärt werden.

E. Zusammenfassung

1. Von 21 Stämmen der Species *M. avium* bzw. *M. intracellulare*, die verschiedene Serotypen repräsentierten (20 Referenzstämmen von SCHAEFER, ein eigenes Isolat) wurden durch Kaninchenimmunisierung Antiseren hergestellt. Dazu wurden i.d.R. hitzeabgetötete Antigene wiederholt intravenös verabreicht. Infolge häufiger intercurrenter Todesfälle konnte nur bei 40 von 68 immunisierten Kaninchen Serum gewonnen werden.
2. Die Auswertung der Seren im Kreuzagglutinationstest gegen das homologe und gegen die heterologen Antigene ergab, daß 23 der 40 hergestellten Immunsere für die weiteren serologischen Untersuchungen brauchbar waren. Die restlichen 17 Seren eigneten sich wegen zu niedriger Titer oder zu starker unspezifischer Kreuzreaktionen nicht für Serotypbestimmungen.
3. Mit den Testseren wurde versucht, bei 96 Mykobakterienstämmen der Gruppe III nach RUNYON, die aus diagnostischem Untersuchungsmaterial stammten, mittels der Langsamagglutination nach SCHAEFER den Serotyp festzustellen. Diese Untersuchungen führten zu folgenden Ergebnissen:
 - a) Von 71 aus Rindern isolierten Stämmen gehörten 11 Stämme zu *M. avium* Serotyp I, 42 Stämme zu *M. avium* Serotyp II₂ und je ein Stamm zu *M. avium* Serotyp II₃ bzw. einem Doppelserotyp II₂/II₃. 2 Stämme gehörten zu *M. intracellulare* Serotyp IV, 2 Stämme zu *M. intracellulare* Serotyp VI und 1 Stamm erwies sich als Serotyp Davis. 11 Stämme konnten auf Grund ihres rauen Wachstums nicht eingeordnet werden, bzw. sie reagierten mit keinem der vorhandenen Antiseren.

- b) Von 18 aus Schweinen isolierten Stämmen gehörten 1 Stamm zu Serotyp I und 9 Stämme zu Serotyp II 2 von *M. avium*. 3 Stämme gehörten zu *M. intracellulare* Serotyp Davis. 5 Stämme konnten aus den gleichen Gründen wie beim Rind nicht eingeordnet werden.
 - c) Von 7 Stämmen mit Herkunft vom Geflügel erwiesen sich 5 als *M. avium* Serotyp II 2, je 1 Stamm gehörte zu *M. intracellulare* Serotyp IV bzw. Davis.
4. Die Herstellung spezifischer Konjugate für immunfluoreszenzserologische Untersuchungen aus den Kaninchen-Antiseren gelang nicht. Die Seren wiesen wahrscheinlich einen zu niedrigen Gehalt an typenspezifischen Immunglobulinen auf.

F. Literaturverzeichnis

1. ANZ, W. und Gertrud MEISSNER: Serotypen von Stämmen der aviären Mykobakteriengruppe, isoliert von Mensch und Tier. Ihre epidemiologischen Beziehungen. Prax. Pneumol. 23, 221 - 230 (1969)
2. ANZ, W., MEISSNER, G. und U. RÖDER: Serologische Untersuchungen an atypischen Mykobakterien mittels der Agglutinationsmethode. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 211, 530 - 550 (1969)
3. ANZ, W., LAUTERBACH, D., MEISSNER, G. und I. WILLERS: Vergleich von Sensitin-Testen an Meerschweinchen mit Serotyp und Hühnervirulenz bei *M. avium*- und *M. intracellulare*-Stämmen. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 215, 536 - 549 (1970)
4. ANZ, W. und G. MEISSNER: Vergleichende Virulenzprüfung am Huhn von transparenten und opaken Kolonien aus Stämmen der aviären Mykobakteriengruppe verschiedener Serotypen. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 221, 334 - 342 (1972)
5. BEERWERTH, W. und K. POPP: Zur epizootologischen Bedeutung der Sägemehleinstreu für das Auftreten der Schweinetuberkulose. Zbl. Vet. Med., B 18, 634 - 645 (1971)
6. BENNEDSEN, J.: Circulating antibodies in experimental mycobacterial infections demonstrated by immunofluorescence. Acta path. microbiol. Scand. 68, 262 - 272 (1966)
7. BENNEDSEN, J.: The specificity of circulating antibodies in experimental infection with *Mycobacterium avium* demonstrated by immunofluorescence. Acta path. microbiol. Scand. 72, 330 - 336 (1968)

8. BLÜMEL, Ute: Untersuchungen über die Differenzierung aviärer und aviumähnlicher Mykobakterien mit Hilfe des Arylsulfatase-Nachweises.
Vet. med. Diss., München (1963)
9. BÖNICKE, R.: Die Klassifizierung atypischer Mykobakterien durch Bestimmung ihrer unterschiedlichen amidatischen Stoffwechselleistungen.
Tuberk. Arzt 14, 209 - 216 (1960)
10. BRAUN, W., EHRLING, F. und G. MEISSNER: Lymphknotenerkrankungen durch Mycobacterium avium und atypische Mykobakterien.
Prax. Pneumol. 27, 662 - 670 (1973)
11. CHOI, Ch., ROYAL, W. A., and J. FRANCIS: The anti-complement fluorescent antibody technique for the identification of mycobacteria.
Tubercle 32, 148 - 150 (1971)
12. DEDIE, K. und W. SCHOENE: Fragen der Tuberkulose und Mykobakteriose nach Tilgung der Rindertuberkulose.
Tierärztl. Umsch. 26, 257 - 265 (1971)
13. ENGEL, H. W. B. und L. G. BERWALD: A simplified agglutination test for serologic typing of mycobacteria.
Amer. Rev. Resp. Dis. 101, 112 - 116 (1970)
14. FEY, H.: Technik der Immunfluoreszenz.
Vet. Bakteriол. Inst. Bern (1971)
15. GILLISEN, G.: Die fluoreszenzserologische Darstellung von Mykobakterien.
Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 207, 58 - 62 (1968)
16. GILMOUR, N. J. L.: The specificity of the fluorescent antibody test in rabbits inoculated with Mycobacterium avium, M. johnei and M. bovis var. BCG.
Res. Vet. Sci. 12, 295 - 297 (1971)

17. HALLMANN, L. und F. BURKHARDT: Klinische Mikrobiologie. Thieme-Verlag Stuttgart, 1974, 4. Aufl., S. 648
18. JONES, W. D., SAITO, H., and G. P. KUBICA: Fluorescent antibody techniques with mycobacteria. Amer. Rev. Resp. Dis. 92, 255 - 260 (1965)
19. JONES, W. D., and G. P. KUBICA: Fluorescent antibody techniques with mycobacteria. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 207, 58 - 62 (1968)
20. JØRGENSEN, J. B., ENGBÆK, H. C., and A. DAM: An enzootic of pulmonary tuberculosis in pigs caused by *M. avium*. 2. Bacteriological studies. Act. vet. Scand. 13, 68 - 86 (1972)
21. JUHLIN, J., and S. WINBLAD: Sero-typing of mycobacteria by a new technique using antibody globulin adsorbed to staphylococcal protein A. Acta path. microbiol. Scand. 81, 179 - 180 (1973)
22. KÄPPLER, W.: Zur Differenzierung von Mykobakterien mit dem Phosphatase-Test. Beitr. klin. Tub. 130, 223 - 226 (1970)
23. KARLSON, A. G., and Ch. O. THOEN: Mycobacterium avium in tuberculous adenitis of swine. Amer. J. vet. Res. 32, 1257 - 1261 (1971)
24. KAUKER, E. und K. ZETTL: Beitrag zur käsigen Lymphknotenentzündung der Schweine. Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 77, 167 - 169 (1964) und 173 - 192 (1964)
25. KAUKER, E. und W. RHEINWALD: Untersuchungen über das Vorkommen atypischer Mykobakterien der Gruppe III nach RUNYON in Einstreu (Sägemehl) und Futter von Schweinen in Nordhessen. Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 85, 384 - 387 (1972)

26. KAZDA, J. und V. DORNETZHUBER: Vergleichende Untersuchungen über die Hühnerpathogenität von Mycobacterium avium und M. brunense. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 208, 529 - 538 (1968)
27. KAZDA, J. und R. HOYTE: Zur Ökologie von Mycobacterium intracellulare Serotyp Davis. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 222, 506 - 509 (1972)
28. KAZDA, J.: Die Bedeutung von Wasser für die Verbreitung von potentiell pathogenen Mykobakterien. I. Möglichkeit für eine Vermehrung von Mykobakterien. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 158, 161 - 169 (1973)
29. KLEEBERG, H. H., and E. E. NEL: Occurrence of environmental atypical mycobacteria in South Africa. Ann. Soc. belge Méd. trop. 53, 405 - 418 (1973)
30. KRAUSE, E.: Die Einzellkultur des Mycobacterium tuberculosis avium - glatte und rauhe Varianten - Tierversuch. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 171, 497 - 503 (1957)
31. KUBALA, E.: B-Galaktosidase-Test. pers. Mitt. von Frau Prof. Dr. G. Meissner, Borstel (1971)
32. KUBIN, M., and E. MATUŠKOVÁ: Serological typing of mycobacteria for tracing possible sources of avian mycobacterial infections in man. Bull. Wld. Hlth. Org. 32, 657 - 662 (1968)
33. KUBIN, M., MATUŠKOVÁ, E., and J. KAZDA: Mycobacterium brunense n. sp. identified as serotype Davis of group III (RUNYON) mycobacteria. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 210, 207 - 211 (1969)

34. LIND, A.: Serologische Untersuchungen von Mykobakterien mit Hilfe der Agar-Gel-Diffusionstechnik.
Zbl. Bakt., I. Abt. Ref. 183, 276 (1962)
35. MARKS, J., JENKINS, P. A., and W. B. SCHAEFER: Identification and incidence of a third type of Mycobacterium avium. Tubercle 50, 394 - 395 (1969)
36. MARTINS, R. R., WALKER, W. E., BATAYIAS, G. E., and P. W. GALES: The production of type specific fluorescent antibody for the identification of mycobacteria. Amer. Rev. Resp. Dis. 108, 979 - 982 (1973)
37. MATSUI, K., and Y. KAWANISHI: Preparation of agglutination antigen of Mycobacterium avium. Nat. Inst. Anim. Hlth Quart. 11, 53 - 54 (1971)
38. MEISSNER, Gertrud: Entwicklung und heutige Situation des Problems der atypischen Mykobakterien. Z. Tuberk. 127, 3 - 8 (1967)
39. MEISSNER, Gertrud: Bakteriologische und biochemische Differenzierung von atypischen Mykobakterien. 2. Symp. Lebensmittelmikrobiologie DVG, Berlin (1970), S. 88 - 109
40. NASSAL, J.: Experimentelle Untersuchungen über die Isolierung, Differenzierung und Variabilität von Tuberkulosebakterien. Zbl. Vet. Med. Beiheft 2, Parey-Verlag Berlin und Hamburg (1961)
41. NASSAL, J.: Isolierung und Differenzierung von Mykobakterien. 2. Symp. Lebensmittelmikrobiologie DVG, Berlin (1970), S. 110 - 115
42. NASSAL, J. und E. FRITSCH: Zur Brauchbarkeit des Mandelamin-Testes bei der Differenzierung von aviären und verwandten Mykobakterien-Stämmen. Prax. Pneumol. 26, 159 - 164 (1972)

43. ONET, E.: Recherches sérologiques sur quelques souches mycobactériennes isolées à partir du porc.
Rec. Méd. Vét. 148, 959 - 965 (1972)
44. PATTYN, S. R.: Serogrouping of Mycobacterium avium and "Battey" mycobacterium.
Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 208, 449 - 452 (1968)
45. PIENING, C., ANZ, W. und G. MEISSNER: Serotyp-Bestimmungen und ihre Bedeutung für epidemiologische Untersuchungen bei der Schweinetuberkulose in Schleswig-Holstein.
Dtsch. tierärztl. Wschr. 79, 316 - 321 (1972)
46. REZNIKOV, M.: Serologically identical "Battey" mycobacteria from lesions in a herd of pigs.
Austr. Vet. J. 46, 239 (1970)
47. REZNIKOV, M., and E. ROBINSON: Serologically identical "Battey" mycobacteria from sputa of healthy piggery workers and lesions of pigs.
Austr. Vet. J. 46, 606 - 607 (1970)
48. REZNIKOV, M., and D. J. DAWSON: Serological investigation of strains of Mycobacterium intracellulare ("Battey"-bacillus) isolated from house-dust.
Med. J. Austr. 1, 682 - 683 (1971)
49. REZNIKOV, M., LEGGO, J. H., and R. E. TUFFLEY: Further investigations of an outbreak of mycobacterial lymphadenitis at a deep-litter piggery.
Austr. Vet. J. 47, 622 - 623 (1971)
50. REZNIKOV, M., and J. LEGGO: Modification of Schaefer's procedure for serotyping of organisms of the Mycobacterium avium-M. intracellulare-M. scrofulaceum complex.
Appl. Microbiol. 23, 819 - 823 (1972)
51. RÖDER, U.: Untersuchungen über die Agglutination von Stämmen der aviären Mykobakterien-Gruppe mit Immunseren.
Med. Diss., Hamburg (1968)

52. RUNYON, E. H.: Anonymous mycobacteria in pulmonary disease.
Med. Clin. N. Amer. 43, 273 (1959)
53. SAITO, H., and G. P. KUBICA: Serologic studies of avian-group III nonphotochromogen complex by agglutination test.
Amer. Rev. Resp. Dis. 98, 47 - 59 (1968)
54. SCHAEFER, W. B., and Z. REGGIARDO: Serologic identification and classification of the mycobacteria other than *M. tuberculosis* encountered in human disease.
Amer. Rev. Resp. Dis. 88, 111 (1963)
55. SCHAEFER, W. B.: Serologic identification and classification of the atypical mycobacteria by their agglutination.
Amer. Rev. Resp. Dis. 92, 85 - 93 (1965)
56. SCHAEFER, W. B.: Serologic identification of the atypical mycobacteria and its value in epidemiologic studies.
Amer. Rev. Resp. Dis. 96, 115 - 118 (1967)
57. SCHAEFER, W. B.: Type-specificity of atypical mycobacteria in agglutination and antibody-absorption tests.
Amer. Rev. Resp. Dis. 96, 1165 - 1168 (1967)
58. SCHAEFER, W. B.: Incidence of the serotypes of *Mycobacterium avium* and atypical mycobacteria in human and animal diseases.
Amer. Rev. Resp. Dis. 97, 18 - 23 (1968)
59. SCHAEFER, W. B., DAVIS, Ch. L., and M. L. COHN: Pathogenicity of transparent, opaque and rough variants of *Mycobacterium avium* in chickens and mice.
Amer. Rev. Resp. Dis. 102, 499 - 506 (1970)

60. SCHAEFER, W. B., BEER, J. V., WOOD, N. A., BOUGHTON, E., JENKINS, P. A., and J. MARKS: A bacteriological study of endemic tuberculosis in birds. J. Hyg. Camb. 71, 549 - 557 (1973)
61. SCHLIESSER, Th.: Weitere Typendifferenzierungen bei der isolierten Lymphknotentuberkulose des Schweines. Arch. Lebensmittelhyg. 15, 250 - 252 (1964)
62. SCHLIESSER, Th. und A. KATIKARIDIS: Neue Typendifferenzierungen bei tuberkulösen Schlachtrindern. Arch. Lebensmittelhyg. 20, 106 - 109 (1969)
63. SCHLIESSER, Th.: Vorkommen und Bedeutung "atypischer" Mykobakterien bei Haustieren. Mitt. f. Tierärzte 22, 3 - 12 (1969)
64. SCHLIESSER, Th.: Zur Bedeutung aviärer und sog. atypischer Mykobakterien in der Veterinärmedizin. 2. Symp. Lebensmittelmikrobiologie DVG, Berlin (1970), S. 14 - 25
65. SCHLIESSER, Th.: Stand und Bedeutung der Tuberkulose der Haustiere 10 Jahre nach Abschluß der Sanierung. Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 85, 191 - 195 (1972)
66. SCHLIESSER, Th.: Zur Frage der Pathogenität von Mykobakterien. Zbl. Vet. Med. Beiheft 17, 40 - 44 (1972)
67. SCHLIESSER, Th. und A. WEBER: Über das Vorkommen von Mykobakterien in Lymphknoten gesunder Schlachtschweine. Dtsch. tierärztl. Wschr. 81, 316 - 318 (1974)
68. SEEGER, J. und G. SCHACK-STEFFENHAGEN: Ursache und Bedeutung der Schweine-tuberkulose für die Gesundheit von Mensch und Tier. Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 80, 226 - 229 (1967)

69. SHEPARD, Ch., and D. KIRSH: Disruption of mycobacteria and their stainability by fluorescent antibody. Referat in Feder. Proc. 20, 16 (1961)
70. SHEPARD, Ch., and D. KIRSH: Fluorescent antibody stainability and other consequences of the disruption of mycobacteria. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 106, 685 - 691 (1961)
71. STENBERG, H. und A. TURUNEN: Differenzierung aus Haustieren isolierter Mykobakterien. Zbl. Vet. Med. B 15, 494 - 503 (1968)
72. STOLL, L.: Vorkommen von aviären Mykobakterien vom Serotyp Davis bei der Lymphknotentuberkulose des Schweines in Südhessen. Dtsch. tierärztl. Wschr. 80, 548 - 550 (1973)
73. SWEENEY, E. E., and G. I. JANN: Carbohydrate typing of mycobacteria. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 108, 671 - 674 (1961)
74. THOEN, C. O., KARLSON, A. G., and A. F. RANNEY: Epidemiology of infections with serotypes of Mycobacterium avium complex in swine and other species. Proceed. 76th Ann. Meet. U.S. Animal Health Association, 423 - 436 (1972)
75. TSUKAMURA, M., and H. NEMOTO: A taxonomic study of Mycobacterium intracellulare isolated from swine. Japan. J. Microbiol. 17, 91 - 98 (1973)
76. VIRTANEN, S.: A study of nitrat reduction by mycobacteria. Acta tuberc. Scand. 48, 1 - 119 und 196 (1960)
77. WAYNE, L. G., DOUBEK, R., and R. L. RUSSEL: Classification and identification of mycobacteria. I. Tests employing Tween 80 as substrate. Amer. Rev. Resp. Dis. 90, 588 - 597 (1964)

78. WOLINSKY, E., and
W. B. SCHAEFER: Proposed numbering scheme for myco-
bacterial serotypes by agglutination.
Intern. J. System. Bacteriol. 23,
182 - 183 (1973)
79. YODER, W. D., and
W. B. SCHAEFER: Comparison of the seroagglutination
test with the pathogenicity test in
the chicken for the identification
of Mycobacterium avium and Mycobac-
terium intracellulare.
Amer. Rev. Resp. Dis. 103, 173 - 178
(1971)
80. YUGI, H., NEMOTO, H.,
and K. WATANABE: Serotypes of Mycobacterium intracel-
lulare of porcine origin.
Nat. Inst. Anim. Hlth Quart. 12,
168 - 169 (1972)
81. YUGI, H., and Ch.
NOZAKI: Serologic diagnosis of bovine tuber-
culosis.
Amer. J. Vet. Res. 33, 1377 - 1384
(1972)

Herrn Prof. Dr. Th. Schliesser möchte ich für die Überlassung des Themas, sein stets gezeigtes Interesse am Fortgang der Arbeit und seine großzügige Unterstützung bei der Durchführung der Versuche danken.

Frau Prof. Dr. Gertrud Meissner gilt mein besonderer Dank für ihr freundliches Entgegenkommen bei der Einweisung in die Methodik der Mykobakterien-Serologie.

Herrn Dr. A. Weber und Frä. I.-M. Schultze danke ich herzlich für ihre wertvolle Hilfe bei der Durchführung meiner Untersuchungen.

Lebenslauf

Am 29. 9. 1943 wurde ich, Ute Neumeier, in Ensheim/Saar geboren.

Nach 5 Volksschuljahren in München besuchte ich von 1954 bis 1963 das Städtische Luisengymnasium in München, wo ich im Juli 1963 die Reifeprüfung ablegte.

Von Oktober 1963 bis September 1965 erhielt ich an der Bayerischen Landesanstalt für Tierseuchenbekämpfung in Oberschleißheim meine Ausbildung als veterinärmedizinisch-technische Assistentin.

Von Oktober 1965 bis September 1967 war ich am Institut für Mikrobiologie und Infektionskrankheiten der Tiere der Universität München als vet.-med. technische Assistentin beschäftigt.

Mit dem Studium der Veterinärmedizin begann ich im Wintersemester 1967/68 an der Ludwig Maximilians-Universität in München. Nach 6 Semestern wechselte ich zur Justus Liebig-Universität Giessen. Dort bestand ich im Januar 1973 die Tierärztliche Prüfung.

Seit 1. 3. 1974 bin ich als wissenschaftliche Bedienstete am Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere beschäftigt.

Druck: Offset Köhler K.G. 63 Giessen-Wieseck

